

Universität Duisburg-Essen

**Reaktivität von NAD(P)H gegenüber Oxidantien bei Bindung an
Dehydrogenasen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

**im Fachbereich Chemie
der Universität Duisburg-Essen**

vorgelegt von

Thorsten Bramey

aus Bergkamen-Overberge

2006

Referent: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2006

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2003 bis Oktober 2006 im Institut für Physiologische Chemie am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

Dank gebührt an erster Stelle

Herrn Prof. Dr. Dr. H. de Groot,

Direktor des Institutes für Physiologische Chemie am Universitätsklinikum Essen, für die Bereitstellung einer wissenschaftlichen Arbeitsstelle und die Überlassung des interessanten Themas sowie die vielen wertvollen Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann

vom Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Dem Betreuer meiner Arbeit,

Dr. rer. nat. Frank Petrat

bin ich dankbar für sein aufopferungsvolles Engagement, seine fortwährende Geduld, die guten Ideen und die wissenschaftliche Begleitung dieser Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Michael Kirsch

danke ich für die gute Zusammenarbeit, die oft fruchtbaren Ratschläge sowie die stete Diskussionsbereitschaft.

Ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Physiologische Chemie, die mich während dieser Zeit kollegial in ihrer Mitte aufgenommen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

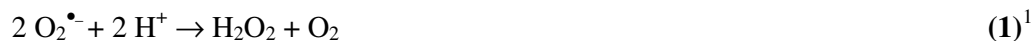
| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1. REAKTIVE SAUERSTOFF- UND STICKSTOFFSPEZIES: QUELLEN UND URSACHEN IHRER INTRAZELLULÄREN BILDUNG | 1 |
| 1.2. DAS ZYTOTOXISCHE POTENTIAL REAKTIVER SAUERSTOFF- UND STICKSTOFFSPEZIES | 3 |
| 1.2.1. Superoxidanionen | 4 |
| 1.2.2. Wasserstoffperoxid | 4 |
| 1.2.3. Hydroxylradikale | 5 |
| 1.2.4. Singulett-Sauerstoff | 5 |
| 1.2.5. Stickstoffmonoxid | 5 |
| 1.2.6. Peroxynitrit | 6 |
| 1.3. ANTIOXIDATIVE MECHANISMEN ZUR NEUTRALISIERUNG REAKTIVER SAUERSTOFF- UND STICKSTOFFSPEZIES | 7 |
| 1.4. ANTIOXIDATIVE BEDEUTUNG FREIER PYRIDINNUCLEOTIDE | 8 |
| 1.5. EINFLUSS VON DEHYDROGENASEN AUF REAKTIONEN VON PYRIDINNUCLEOTIDEN MIT REAKTIVEN SPEZIES: STAND DER FORSCHUNG | 10 |
| 1.6. PROBLEMSTELLUNG | 11 |
| 2. ERGEBNISSE..... | 12 |
| 2.1. BINDUNGSSTÖCHIOMETRIE ZWISCHEN DEN DEHYDROGENASEN UND DEN COENZYMEN NADH UND NADPH | 12 |
| 2.2. EINFLUSS DER DEHYDROGENASEN AUF DIE DURCH O ₂ UND H ₂ O ₂ INDUZIERT OXIDATION VON NADH ODER NADPH | 14 |
| 2.3. EINFLUSS DER DEHYDROGENASEN AUF DIE DURCH HNO ₂ INDUZIERT OXIDATION VON NADH ODER NADPH | 21 |
| 2.4. EINFLUSS DER DEHYDROGENASEN AUF DIE DURCH SIN-1 INDUZIERT OXIDATION VON NADH ODER NADPH | 22 |
| 2.5. EINFLUSS DER DEHYDROGENASEN AUF DIE DURCH AUTHENTISCHES PEROXYNITRIT INDUZIERT OXIDATION VON NADH ODER NADPH | 24 |
| 3. DISKUSSION..... | 29 |
| 3.1. EINFLUSS DER UNTERSUCHTEN DEHYDROGENASEN AUF DIE NAD(P)H-OXIDATION | 29 |
| 3.2. MÖGLICHE PRO- UND ANTIOXIDATIVE BEDEUTUNG DER BINÄREN DEHYDROGENASE-COENZYMKOMPLEXE FÜR DIE ZELLE | 31 |

| | |
|--|----|
| 3.3. ANMERKUNGEN ZU DEN KINETISCHEN SIMULATIONEN | 32 |
| 4. ZUSAMMENFASSUNG..... | 34 |
| 5. MATERIAL UND METHODEN..... | 36 |
| 5.1. MATERIAL | 36 |
| 5.1.1. Chemikalien | 36 |
| 5.1.2. Materialien & Geräte | 38 |
| 5.2. METHODEN | 39 |
| 5.2.1. Herstellung von Peroxynitrit | 39 |
| 5.2.2. Bestimmung der Bindungsstöchiometrie zwischen LDH und NADH sowie NADPH | 40 |
| 5.2.3. Bestimmung der Bindungsstöchiometrie zwischen weiteren Dehydro- genasen und NADH bzw. NADPH | 41 |
| 5.2.4. Messung des Effekts von O ₂ , H ₂ O ₂ und HNO ₂ auf die NADH- oder NADPH-Oxidation in Gegenwart von Dehydrogenasen | 41 |
| 5.2.5. Bestimmung des Effektes von Peroxynitrit auf die Oxidation von NADH oder NADPH in An- und Abwesenheit von Dehydrogenasen | 42 |
| 5.2.6. Kinetische Simulationen der NADH- oder NADPH-oxidierenden Reaktionen | 43 |
| 5.2.7. Statistik | 44 |
| 6. LITERATUR..... | 45 |
| 7. ANHANG..... | 58 |
| 7.1. ABKÜRZUNGEN | 58 |
| 7.2. TABELLEN | 59 |
| 7.3. VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DIESER ARBEIT | 63 |
| 7.4. WEITERE VERÖFFENTLICHUNGEN | 63 |
| 7.5. LEBENS LAUF | 64 |

1. EINLEITUNG

1.1. REAKTIVE SAUERSTOFF- UND STICKSTOFFSPEZIES: QUELLEN UND URSACHEN IHRER INTRAZELLULÄREN BILDUNG

Als Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (reactive oxygen species = ROS oder reactive nitrogen oxygen species = RNOS) wird eine Gruppe von chemisch reaktiven Molekülen bezeichnet, die sich allesamt von molekularem Sauerstoff ableiten [1]. Die Reaktivität ist je nach Spezies sehr variabel. So kann man hoch reaktive, wie z.B. das Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$) oder das Peroxynitritanion ($1-$) (ONOO^-), und weniger reaktive Spezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und dessen Vorläufer Superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) unterscheiden (Gleichung 1 [2]).



Bis auf wenige Ausnahmen handelt es sich bei den ROS und RNOS um intrazellulär gebildete freie Radikale, d.h. Moleküle geringer Größe mit einem ungepaarten Elektron, die je nach Spezies mehr oder weniger stark mit Biomolekülen reagieren. Hierbei kann eine Kettenreaktion initiiert werden, in deren Folge weitere Radikale entstehen. Derartige Kettenreaktionen können nur durch Radikalfänger bzw. primäre Antioxidantien terminiert werden ([1], siehe dazu auch 1.3.)

RNOS und ROS werden von allen aerob lebenden Organismen gebildet und wieder abgebaut. In physiologischen Konzentrationen erfüllen sie verschiedene Zellfunktionen, z.B. bei der intra- und interzellulären Signalübertragung und der Redox-Regulation. Zellschädigender „oxidativer Stress“ entsteht, sobald der prooxidative Einfluss die antioxidative Kapazität der Zelle übersteigt [1].

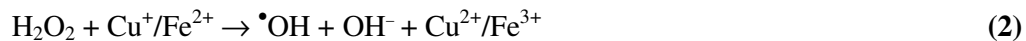
Die Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies in eukaryoten Zellen ist die mitochondriale oxidative Phosphorylierung [4]. Mitochondrien von Zellen mit einem oxidativen Energiestoffwechsel verbrauchen ca. 80 % des gesamtzellulär benötigten Sauerstoffs. Durch Elektronenlecks in der Atmungskette werden bis zu 5 % des konsumierten Sauerstoffs zu freiem Superoxid reduziert [1, 5]. Die Produktion von $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 kann unter Bedingungen extremer körperlicher Anstrengung im Skelett- und im Herzmuskel erhöht sein, also dann, wenn ein Mangel des Elektronenendakzeptors O_2 die terminale Respiration

¹ Bei dieser Reaktion kann nach Khan & Kasha [3] neben molekularem Sauerstoff (O_2) auch Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) entstehen.

inhibiert und die Elektronencarrier der Atmungskette reduziert vorliegen [6]. Aber auch pathologische Bedingungen, hervorgerufen durch z.B. Xenobiotika, Hyperoxie [7], Ethanol, Hypoxie [8], Entzündungen [9] sowie Ischämie/Reperfusion [10], können eine erhöhte Superoxidproduktion verursachen. Häufig kann aufgrund des aufgetretenen oxidativen Stresses eine erhöhte Lipidperoxidation beobachtet werden [6].

Die NADPH-Oxidase ist einer der primären Enzymkomplexe, die an der Abwehr von Bakterien durch Neutrophile und andere phagozytotische weiße Blutkörperchen beteiligt sind. Die NADPH-Oxidase der Neutrophile, ein membranassoziierter Multiuntereinheiten-Komplex, reduziert unter Verbrauch von NADPH molekularen Sauerstoff zu Superoxid und entlässt dieses in das Phagosom [11]. Weitere Superoxid- bzw. Wasserstoffperoxid-produzierende Enzyme sind Xanthin-Oxidase, Lipoxygenase, Cyclooxygenase, Monoamin-Oxidase, Tyrosin-Hydroxylase und L-Aminosäure-Oxidase [1, 5].

Aus der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit sogenannten redoxaktiven Metallionen (Fe^{2+} oder Cu^+) werden in der Fenton-Reaktion (Gleichung 2) hoch reaktive Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$) gebildet, die nahezu jedes Biomolekül oxidieren können [12, 13].



Die oxidierten Metallionen können z.B. durch Superoxidanionen wieder reduziert werden (Gleichung 3). Die Summe aus Gleichung 2 und 3 wird allgemein auch als Haber-Weiss Reaktion bezeichnet [1].

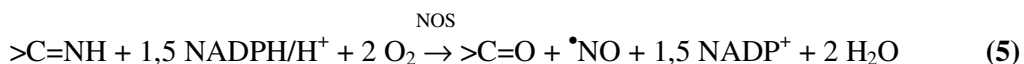


Die Haber-Weiss Reaktion ist neben der Spontandismutation des Superoxids (Gleichung 1) und dem Elektronentransfer von $\text{O}_2^{\bullet-}$ auf $\bullet\text{OH}$ (Gleichung 4) ein weiterer Reaktionsweg, über den *in vivo* auch Singulett-Sauerstoff entstehen kann [3]. Hauptsächlich entsteht Singulett-Sauerstoff jedoch photochemisch [14].



Eine weitere Spezies, das Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$), reagiert trotz eines ungepaarten Elektrons nur mit wenigen Biomolekülen und ist diesbezüglich dem Superoxid sehr ähnlich. Mit freien Radikalen (z.B. Peroxyl- und Alkylradikale) reagiert es unter Bildung nur schwach reaktiver

Moleküle hingegen sehr schnell und fungiert daher auch als freier Radikalfänger. Überdies ist $\bullet\text{NO}$ ein weit verbreiteter intra- und interzellulärer Botenstoff [1]. Synthetisiert wird $\bullet\text{NO}$ von Enzymen der Stickstoffmonoxid-Synthase-Familie (NOS, EC 1.14.13.39 [1, 5]), wobei L-Arginin zu L-Citrullin oxidiert wird (Gleichung 5 [15]).



Die Reaktion ist abhängig von der Interaktion mit dem Calcium-bindenden Protein Calmodulin; Sauerstoff dient als Cosubstrat, NADPH als Elektronendonator. Weiterhin binden alle NOS Tetrahydrobiopterin (H4Bip), dessen Bedeutung jedoch noch nicht restlos geklärt ist [15].

$\bullet\text{NO}$ wird durch mehrere Zelltypen produziert: Endothelzellen, Makrophagen, Neutrophile und Neuronen [16]. Allein in der Leber können drei verschiedene NOS unterschieden werden: Die neuronale Form (nNOS) im peribiliären Plexus, die induzierbare Form (iNOS) in Hepatozyten, Cholangiozyten, Kupffer- und Stellatzellen sowie die endotheliale NOS (eNOS) in Endothelzellen [17]. Makrophagen produzieren für die Bekämpfung pathogener Keime neben $\bullet\text{NO}$ auch $\text{O}_2\bullet^-$. Beide Radikale reagieren nahezu diffusionskontrolliert miteinander ($k = 3,9\text{-}19 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [18]) und bilden so Peroxynitrit, das wie das Hydroxylradikal ein hohes zytotoxisches Potential besitzt [19].

1.2. DAS ZYTOTOXISCHE POTENTIAL REAKTIVER SAUERSTOFF- UND STICKSTOFFSPEZIES

RNOS und ROS können, wie schon unter 1.1. erwähnt, mit einer Vielzahl von Biomolekülen reagieren, z.B. oxidieren, nitrosieren und nitrieren sie Proteinseitenketten [20], ungesättigte Fettsäuren der Membranphospholipide, Basenreste von Nucleinsäuren [21] und Glutathion [1]. In physiologischen Konzentrationen können sie als Mediatoren von Transkriptionsfaktoren [1] oder als Second Messenger von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen und Neurotransmittern bei der intrazellulären Signaltransduktion in Erscheinung treten [4]. In hohen Konzentrationen wirken sie allerdings schädigend. Beispielsweise können sie die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran erhöhen, so dass es durch die daraus resultierende Ca^{2+} -Akkumulation zur Depolarisierung der Membran und folglich zur

Entkopplung kommt [15]. Kann die Zelle kein ATP mehr synthetisieren, führt der Energiemangel unweigerlich zum Zelluntergang. Somit tragen ROS und RNOS zu Alterungsprozessen, zur Krebsentstehung und zu diversen akuten und degenerativen Erkrankungen bei [22, 23].

Nachfolgend soll detailliert auf die zelluläre bzw. pathophysiologische Bedeutung der unter 1.1. erwähnten Oxidantien eingegangen werden.

1.2.1. Superoxid

Die besondere Bedeutung des Superoxidanions ($O_2^{\bullet-}$) resultiert vor allem daraus, dass es durch seine Reaktion mit anderen Radikalen oder nach seiner Dismutation an der Bildung reaktiverer Spezies beteiligt sein kann (siehe 1.1.). Es ist als geladenes Radikal in Abwesenheit von Anionenkanälen membranimpermeabel und verbleibt somit im Kompartiment seiner Entstehung. Bei einer Gewebsazidose kann $O_2^{\bullet-}$ jedoch zum Perhydroxylradikal (HO_2^{\bullet}) protoniert werden, das gut membrangängig und zudem wesentlich reaktiver ist [24]. Ein Zusammenhang zwischen der primären Produktion von $O_2^{\bullet-}$ während der Atmungskettenaktivität in der inneren Mitochondrienmembran, sekundären freien Radikalreaktionen innerhalb der Membran und der mitochondrialen Matrix und einer Reihe von Erkrankungen, die das Zentrale Nervensystem beeinträchtigen, wie z.B. Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Dyskinesia tarda, Down-Syndrom und Schlaganfall, ist wissenschaftlich belegt worden [5].

1.2.2. Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist kein freies Radikal, spielt aber pathophysiologisch aufgrund seiner Membranpermeabilität und seiner Bedeutung als Intermediat bei der Produktion von reaktiveren ROS eine wichtige Rolle. Es kann enzymkatalytisch durch die Myeloperoxidase (Gleichung 6), ein Enzym aus dem Phagosom der Neutrophilen, oder durch die Reaktion mit Übergangsmetallionen zur Bildung hoch reaktiver Spezies wie dem Hydroxylradikal (Gleichung 2) und der Hypochlorigen Säure beitragen (Gleichung 6 [1]).



Allerdings kann Wasserstoffperoxid einige Biomoleküle wie Glutathion, NADPH und Lipide auch direkt oxidieren [4]. Außerdem oxidiert es Schwefel enthaltende Aminosäuren [25] wie Cystein und Methionin und inaktiviert so viele Enzyme, z.B. die Alkohol-Dehydrogenase (ADH [26]), Aldehyd-Dehydrogenase (AIDH [27]) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH [28]). In physiologischen Konzentrationen spielt H_2O_2 auch eine Rolle als intrazelluläres Signalmolekül [1].

1.2.3. Hydroxylradikale

Hydroxylradikale (OH^\bullet) reagieren nahezu diffusionskontrolliert mit jedem Biomolekül, einschließlich der DNA, Lipiden und Proteinen, woraus ein Verlust der genomischen Stabilität, der Zellintegrität und die Hemmung von Enzymfunktionen resultieren kann [29]. Es wurde nachgewiesen, dass Hydroxylradikale an vaskulären Erkrankungen wie der Arteriosklerose beteiligt sind, indem sie Lipoproteine und endotheliales Gewebe zerstören [30].

1.2.4. Singulett-Sauerstoff

Es ist bekannt, dass Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) *in vitro* und *in vivo* sehr schnell mit NADH und NADPH reagiert ($k = 2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [31-33]). Die stabilen Produkte sind Wasserstoffperoxid und zu 80 % enzymatisch aktives NAD(P)^+ [31]. Eine massive Oxidation des NAD(P)H kann durch den nachfolgenden Energiemangel zum Zelluntergang führen [32]. Weiterhin wird dem Singulett-Sauerstoff eine ursächliche Beteiligung bei der Lipidperoxidation [34] sowie beim Grauen Star (Katarakt [14]) und bei Hautschäden [35] zugeschrieben.

1.2.5. Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ($^\bullet\text{NO}$) gehört eigentlich nicht zu den RNOS, kann aber ebenfalls mit verschiedenen Biomolekülen reagieren, vor allem mit solchen, die Eisenionen oder Thiolgruppen besitzen. Es inhibiert z.B. die antioxidativen Enzyme Katalase, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-S-Transferase und Glutathion-Reduktase [36], aber auch AIDH [37], GAPDH [38] und Caspasen [39]. Bei erhöhter oder exzessiver Produktion wirkt $^\bullet\text{NO}$ zytotoxisch. Es verhindert die Zellteilung [40] und kann ein wichtiger Faktor bei

Nervenschäden sein sowie eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen spielen [5].

Viele Studien zeigten allerdings auch, dass $\bullet\text{NO}$ oxidative Schäden in experimentellen Zellmodellen, bei Hyperoxie-induzierten Gehirnschäden, bei der experimentellen Pankreatitis, der Xenobiotikatoxizität, bei intestinalen und gastrischen Läsionen sowie bei geschlossenen Kopfverletzungen [41] und der Endotoxämie [16] vermindern und sogar inhibieren kann. Weiterhin wirkt $\bullet\text{NO}$ zytoprotektiv in einer Reihe von Ischämie/Reperfusionsschäden [16]. Auch die Lipidperoxidation in Zellmembranen kann durch $\bullet\text{NO}$ inhibiert werden [1]. Insgesamt ist der Effekt von $\bullet\text{NO}$ auf den Redox-Status einer Zelle sehr facettenreich, wobei die Fälle, in denen es antioxidativ wirkt, überwiegen [1]. Jedoch können hohe $\bullet\text{NO}$ -Konzentrationen durch die Reaktion mit der Häm- α_3 - und der Cu_B -Gruppe der Cytochrom-Oxidase die mitochondriale Elektronentransportkette inhibieren, was u.a. zu einem intramitochondrialen Anstieg der NAD(P)H-Konzentration und schließlich zum Zelltod führt [16].

Als bedeutender vasoaktiver Modulator des Gewebsblutflusses und des arteriellen Druckes [16] sorgt $\bullet\text{NO}$ über die Stimulation der Guanylat-Cyclase und die Inaktivierung der Protein-Kinase C für die Entspannung der glatten Muskulatur der Blutgefäße und bewirkt so eine Gefäßdilatation [1].

Aufgrund seiner Membranpermeabilität kann $\bullet\text{NO}$ auch als interzellulärer Botenstoff [1], z.B. bei der Neurotransmission, eine Rolle spielen. Weiterhin ist es an Immunzellfunktionen beteiligt und scheint die adhesive Interaktion zwischen Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen zu beeinflussen [16].

1.2.6. Peroxynitrit²

Peroxynitrit reagiert mit Kohlendioxid (CO_2) zu dem hoch reaktiven Nitroso-Peroxocarbonylat (ONOOCO_2^-) oder zerfällt protoniert als Peroxysalpetrige Säure homolytisch zu $\bullet\text{OH}$ und $\bullet\text{NO}_2$; es kann aber auch zu Nitrat umlagern [1]. Welcher Weg dominiert ist abhängig von der Temperatur, dem pH-Wert und den Molekülen des umgebenden Milieus [42, 43].

² Der Terminus Peroxynitrit wird in der weiteren Arbeit als Beschreibung des Säure-Base-Äquilibrium des Peroxynitritanions (1^-) (ONOO^-) und der Peroxysalpetrigen Säure (ONOOH) genutzt.

Die Reaktivität des Peroxynitrits gegenüber Biomolekülen, z.B. Lipiden [34] und insbesondere Proteinen, ist sehr hoch. Die Oxidation oder Nitrierung von Aminosäureseitenketten, vorwiegend Cystein, Tyrosin, Methionin und Tryptophan [44], verursacht vielfach eine Inaktivierung von Proteinen, wie dies z.B. belegt ist für die Succinat-Dehydrogenase [45], Glutamin-Synthetase [46], Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase [47], Alkohol-Dehydrogenase [26], Isocitrat-Dehydrogenase [48], Mn^{2+} -Superoxid Dismutase [49], Glutathion-Reduktase [50] und die Glutathionperoxidase [51]. Einige Enzyme wie Cyclooxygenase [52], Poly-ADP-Synthetase [53] und Matrix-Metalloprotease [54] werden hingegen durch Peroxynitrit aktiviert.

Insbesondere die durch Peroxynitrit verursachte Nitrierung von Tyrosinresten spielt eine entscheidende Rolle bei pathologischen Prozessen. In Untersuchungen zu zahlreichen Entzündungs- und Infektionskrankheiten (z.B. Arteriosklerose, koronare Herzkrankheiten, kongestive Herzerkrankung, Host-versus-Graft-Reaktion (Abstoßungsreaktion), amyotrophe Lateralsklerose, Morbus Parkinson und Schlaganfall) wurde das Produkt 3-Nitrotyrosin gefunden [55]. Weitere Erkrankungen, an denen Peroxynitrit beteiligt ist, sind: Morbus Alzheimer [56], Chorea Huntington [57], Hochdruckerkrankungen [58], Multiple Sklerose [59], Autoimmun-Myocarditis [60], Erkrankungen der Lunge [61] und generell Ischämie/Reperfusionsschäden [62]. Andererseits ist Peroxynitrit als eine durch Phagozyten generierte mikrobiozide Spezies ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr [63].

1.3. ANTIOXIDATIVE MECHANISMEN ZUR NEUTRALISIERUNG REAKTIVER SAUERSTOFF- UND STICKSTOFFSPEZIES

Man kann zwischen direkten und indirekten Antioxidantien sowie antioxidativ wirkenden Enzymen unterscheiden. Mulder *et al.* [64] verdeutlichten anhand der Lipidperoxidation (Gleichung 8-11; Lipide = hier RH) durch das Peralkoxyradikal (ROO^\bullet) die Anforderungen, die ein direktes Antioxidans zu erfüllen hat.

Kettenreaktion:



Kettenabbruch:



Unter der Annahme, dass die Konzentration des Antioxidans (AH) die Lipidkonzentration nicht übersteigt, muss die Geschwindigkeitskonstante für den Hydrogentransfer vom Antioxidans auf das Radikal (Gleichung 10) höher sein als die der Reaktion des Peroxylradikals mit dem Lipid. Außerdem muss das radikalische Antioxidans (A^\bullet) mit einem weiteren Peroxylradikal zu nicht-radikalischen Produkten reagieren (Gleichung 11). Weitere Bedingungen sind, dass weder AH noch A^\bullet mit molekularem Sauerstoff und A^\bullet nicht mit dem zu schützenden Molekül, hier Lipide (RH), reagieren dürfen. Ist eine der angeführten Bedingungen nicht erfüllt, so ist die interagierende Substanz per Definition kein direktes Antioxidans. Im allgemeinen handelt es sich bei primären Antioxidantien um niedermolekulare Verbindungen, wie z.B. Vitamin C und E, Glutathion, Ethanol, Mannitol, S-Adenosyl-Methionin, Sylimarin, N-Acetyl-Cystein und Ursodesoxycholsäure [17, 65].

Antioxidativ wirkende Enzyme sind z.B. die Glutathion-Peroxidase in Kombination mit der Glutathion-Reduktase, Ascorbat-Reduktase, Peroxyredoxine, Katalase, Thioredoxin-Reduktase, Mn-Superoxid-Dismutase und Cu-Zn-Superoxid-Dismutase [1].

Indirekt wirkende Antioxidantien sind z.B. NADH und NADPH, die bei der Regenerierung primärer Antioxidantien enzymatisch (z.B. durch Glutathion-Reduktase oder Ascorbat-Reduktase) verbraucht werden [66].

1.4. ANTIOXIDATIVE BEDEUTUNG FREIER PYRIDINNUCLEOTIDE

Die Pyridinnucleotide Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH/NAD^+) und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADPH/NADP^+) setzen sich aus zwei durch eine Phosphorsäureanhydridbindung verbundene Nucleotide zusammen (Abb. 1). Sie dienen in der Zelle als Coenzyme für Dehydrogenasen, die den Nicotinamidring reversibel reduzieren beziehungsweise oxidieren. Obwohl sich NADPH/NADP^+ nur durch eine zusätzliche Phosphatgruppe an der adeninseitigen Ribose von NADH/NAD^+ unterscheidet, sind beide Coenzyme in der Zelle an unterschiedlichen Reaktionen beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen ist der intrazelluläre NAD^+/NADH -Quotient hoch, was eine gute Voraussetzung für die Beteiligung an oxidativen, katabolen Prozessen (z.B. Substratkettenphosphorylierung

und oxidative Phosphorylierung) ist. Im Gegensatz hierzu liegt NADPH in höheren Konzentrationen als NADP^+ vor und ist damit hauptsächlich an reduktiven, anabolen Reaktionen beteiligt [67].

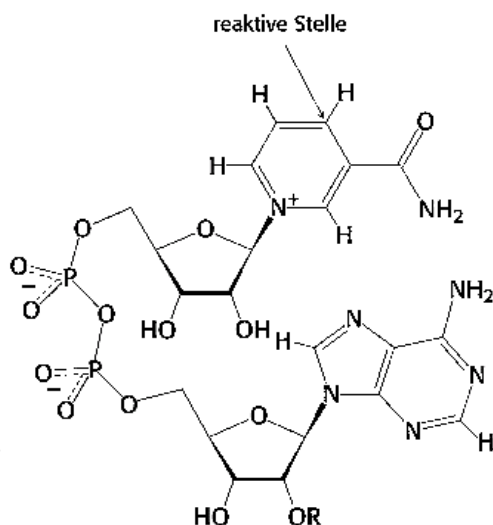


Abb. 1. Strukturen der oxidierten Formen von Nicotinamid-Elektronen-Carriern. Nicotinamadenindinucleotid (NAD^+ , $\text{R} = \text{H}$), Nicotinamadenindinucleotidphosphat (NADP^+ , $\text{R} = \text{PO}_3^-$) (aus: Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L.; Biochemie; 2003, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin)

Nach allgemeiner Lehrauffassung wird bei der Reduktion eines Substrates ein Hydrid-Ion (H^- , = ein Proton mit zwei Elektronen) vom Coenzym auf das Substrat übertragen (Gleichung 12). Hierbei wird der ungeladene chinoide Ring der Nicotinamideinheit in einen benzoiden Ring mit fixierter positiver Ladung am Ringstickstoff umgewandelt.



Im Gegensatz hierzu postulierte Michaelis [68] einen zweistufigen Mechanismus mit einem freien radikalischen Intermediat, ähnlich dem NAD^\bullet -Radikal. Nicht-enzymatisch werden NADH und/oder NADPH durch verschiedene Oxidantien, wie z.B. Br^\bullet , $(\text{SCN})_2^\bullet$ [69], Phenoxyl-Radikale [70], $^1\text{O}_2$ [31, 32], Peroxynitrit ($\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ [71]) und davon freigesetzte Radikale wie $\text{CO}_3^{\bullet-}$ und $^\bullet\text{NO}_2$ [65], Peroxyl-Radikale (ROO^\bullet [72]), das Ferricyanid-Ion $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ [73], 2,6-Dichlorophenol-Indophenol [74], Riboflavin [75], Chinone [76] und Phenazine [77] sowie durch DNA-Cu (II) [78] über einen Ein-Elektronentransfer (Gleichung 13) oxidiert.



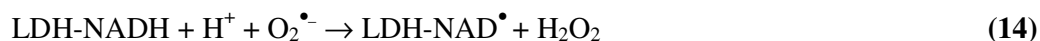
Dies veranlasste Kirsch & de Groot [65] die reduzierten Nicotinamiddinucleotide aus ihrem Status des indirekt operierenden Antioxidans, wie z.B. als Coenzym der Glutathion-Reduktase bei der Glutathionregenerierung [79], heraus in den Status eines direkt operierenden Antioxidans zu erheben.

1.5. EINFLUSS VON DEHYDROGENASEN AUF REAKTIONEN VON PYRIDIN-NUCLEOTIDEN MIT REAKTIVEN SPEZIES: STAND DER FORSCHUNG

In der Zelle liegen NAD(H) und NADP(H) vorwiegend an Proteine gebunden vor [80]. Eine besondere Rolle kommt hierbei den NADH- und NADPH-abhängigen Dehydrogenasen bzw. Oxidoreduktasen zu, einer enzymatisch sehr effektiv arbeitenden Enzymklasse [81]. Für einige dieser Enzyme ist beschrieben worden, dass Pyridinnucleotide durch die Bindung an die Coenzymbindungsstelle die jeweiligen Enzyme vor Angriffen durch Oxidantien schützen [82-84] und oxidierte Enzyme teilweise sogar reparieren [85] können.

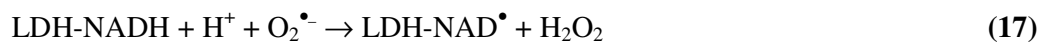
Bielski und Chan [86-91] zeigten, dass die Bindung an die Lactat-Dehydrogenase (LDH) die Reaktivität des NADHs gegenüber Superoxidanionradikalen ($\text{O}_2^{\bullet-}$) und dem Perhydroxylradikal (HO_2^\bullet) signifikant erhöht. Diese Radikale initiieren und propagieren die Oxidation von LDH-gebundenem NADH über einen radikalischen Kettenmechanismus (Gleichung 14-17).

Kettenstart:



Kettenreaktion:





Diese Ergebnisse demonstrieren jedoch, dass NADH in Gegenwart von LDH im Gegensatz zu den oben aufgeführten antioxidativen Eigenschaften [32, 65, 92] prooxidativ wirkt, da das initiierte $\text{O}_2^{\bullet-}$ durch die Reaktion von NAD^{\bullet} mit molekularem Sauerstoff regeneriert und zusätzlich ein H_2O_2 -Molekül pro Kettenstart (Gleichung 14) und eines pro Kettenreaktion (Gleichung 17) gebildet wird.

1.6. PROBLEMSTELLUNG

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob neben Superoxid auch weitere schwache Oxidantien (O_2 , H_2O_2 , HNO_2) sowie starke Oxidantien wie Peroxynitrit eine Radikalkettenreaktion unter Beteiligung des binären LDH-NADH-Komplexes initiieren, die durch $\text{O}_2^{\bullet-}$ oder ein anderes Radikal propagiert wird.

Schon Bielski & Chan [86] mutmaßten, dass die Bindung des NADHs an die LDH die chemischen Eigenschaften des Coenzymen derart verändert, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit dem unspezifischen Oxidans $\text{O}_2^{\bullet-}$ um mehrere Größenordnungen ansteigt. In einer jüngeren Arbeit anderer Autoren [93] stellte man anhand molekular-dynamischer Untersuchungen fest, dass die LDH bei der Coenzymbindung die entropische Aktivierungsenergie durch eine Veränderung der NADH-Konformation zu einer dem Übergangszustand ähnlichen Struktur entscheidend herabsetzt. Da der strukturelle Aufbau der Coenzymbindungsstelle, die sogenannte Rossmann-Falte, bei einigen Dehydrogenasen sehr ähnlich ist [94-96], sollte auch die Coenzymbindung durch diese Dehydrogenasen die Reaktionsgeschwindigkeit von NADH und/oder NADPH mit diversen Oxidantien entscheidend erhöhen.

Aus den über 200 Enzymen, die Reaktionen katalysieren, an denen NAD(H) und NADP(H) beteiligt sind, wurden die Alkohol-Dehydrogenase (ADH), Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6-PDH), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) und die Malat-Dehydrogenase (MDH) ausgewählt und ebenfalls dahingehend untersucht, ob diese Enzyme die Reaktivität ihres Coenzymen gegenüber Oxidantien wie O_2 , H_2O_2 , HNO_2 und Peroxynitrit erhöhen und sich auch hier einem Kettenstart eine Radikalkettenreaktion anschließt.

2. ERGEBNISSE

2.1. BINDUNGSSTÖCHIOMETRIE ZWISCHEN DEN DEHYDROGENASEN UND DEN COENZYMEN NADH UND NADPH

Bei der LDH verläuft die Coenzym- und die Substratbindung in einem sukzessiven Prozess, und zwar ermöglicht die Bindung des Coenzym erst die Bindung des Substrats [97, 98]. Aus diesem Grund ist es möglich, die Bindungsstöchiometrie von LDH und NADH, wie auch für andere Dehydrogenasen beschrieben [99], in Abwesenheit des Substrates zu bestimmen. Wenn die Coenzymkonzentration die Apoenzymkonzentration um das 40-fache übersteigt, werden pro LDH Tetramer immer vier Moleküle NADH gebunden (Abb. 2), d.h. ein NADH Molekül pro Untereinheit [94, 100, 101].

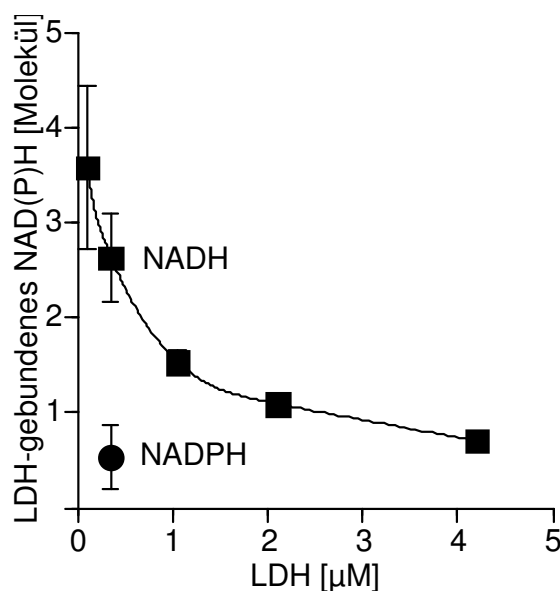


Abb. 2. Bindungsstöchiometrie von Lactat-Dehydrogenase und NAD(P)H. Die Bestimmung der Bindungsstöchiometrie von NADH/NADPH und Lactat-Dehydrogenase (LDH) erfolgte in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 20°C) mittels Ultrazentrifugation. NADH oder NADPH (4,2 µM) wurde mit oder ohne LDH (0,1-4,2 µM) in Phosphat-Puffer inkubiert. Dann wurde die Enzymaktivität bestimmt und ein Fluoreszenzspektrum von NADH bzw. NADPH ($\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em.}} = 400\text{-}600 \text{ nm}$) mit einem Spektralfluorometer aufgenommen. Nach der Zentrifugation bei $371000 \times g$ und 20°C für 5 h, wurden die Enzymaktivität und die Fluoreszenzspektren im Überstand vor und nach Resuspendierung des Pellets gemessen. Die Konzentration von NADH bzw. NADPH, die an das Enzym gebunden hat, wurde durch die Differenz der Fluoreszenzintensität im Überstand vor und nach Zentrifugation sowie nach Korrektur um den Betrag, der in LDH-freien Ansätzen nach 5 h Zentrifugation verloren ging, kalkuliert. Die Bindungsstöchiometrie wurde dann aus dem Quotient des LDH-gebundenen NADHs bzw. NADPHs und der Enzymkonzentration berechnet. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

2. Ergebnisse

Tabelle I. Enzymkinetische Hintergrunddaten zu den experimentell verwendeten Dehydrogenasen

| Eintrag | Reaktion | k [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]* | Bemerkungen | Lit. |
|---------|--|--|---|-------|
| 1 | Enzyme + $\text{NAD(P)H}^{\pm} \rightarrow \text{Enzyme-NAD(P)H}$ | $1,0 \times 10^6$ | Abgeleitet aus Daten der Lit. Enzyme = LDH, MDH, G6-PDH, ADH, GAPDH, AIDH, ICDH, GIDH | [102] |
| 2 | $\text{LDH-NADH} \rightarrow \text{LDH} + \text{NADH}$ | $1,0 \times 10^1$ | aus Eintrag 1 und $K_m = 1,07 \times 10^{-5}$ | [98] |
| 3 | $\text{GAPDH-NADH} \rightarrow \text{GAPDH} + \text{NADH}$ | 3,3 | aus Eintrag 1 und $K_m = 3,3 \times 10^{-6}$ | [98] |
| 4 | $\text{Enzyme-NAD(P)H} \rightarrow \text{Enzyme} + \text{NAD(P)H}$ | $1,0 \times 10^1$ | Annahme: identisch mit Eintrag 2 Enzyme = MDH, G6-PDH, AIDH, ADH, ICDH, GIDH | |
| 5 | $\text{Enzyme} + \text{NAD(P)}^+ \rightarrow \text{Enzyme-NAD(P)}^+$ | $1,0 \times 10^6$ | Abgeleitet aus Daten der Lit. Enzyme = LDH, MDH, G6-PDH, ADH, GAPDH, AIDH, ICDH, GIDH | [102] |
| 6 | $\text{LDH-NAD}^+ \rightarrow \text{LDH} + \text{NAD}^+$ | $2,5 \times 10^2$ | aus Eintrag 5 und $K_m = 2,53 \times 10^{-4}$ | [98] |
| 7 | $\text{MDH-NAD}^+ \rightarrow \text{MDH} + \text{NAD}^+$ | $2,5 \times 10^2$ | Annahme: identisch mit Eintrag 6 | |
| 8 | $\text{G6-PDH-NAD}^+ \rightarrow \text{G6-PDH} + \text{NAD}^+$ | $1,2 \times 10^2$ | aus Eintrag 5 und $K_m = 1,15 \times 10^{-4}$ | [98] |
| 9 | $\text{G6-PDH-NADP}^+ \rightarrow \text{G6-PDH} + \text{NADP}^+$ | 7,6 | aus Eintrag 5 und $K_m = 7,6 \times 10^{-6}$ | [98] |
| 10 | $\text{GAPDH-NAD}^+ \rightarrow \text{GAPDH} + \text{NAD}^+$ | $1,3 \times 10^1$ | aus Eintrag 5 und $K_m = 1,3 \times 10^{-5}$ | [98] |
| 11 | $\text{AIDH-NAD}^+ \rightarrow \text{AIDH} + \text{NAD}^+$ | $2,0 \times 10^1$ | aus Eintrag 5 und $K_m = 2,0 \times 10^{-5}$ | [98] |
| 12 | $\text{AIDH-NADP}^+ \rightarrow \text{AIDH} + \text{NADP}^+$ | $5,0 \times 10^1$ | aus Eintrag 5 und $K_m = 5,0 \times 10^{-5}$ | [98] |
| 13 | $\text{ADH-NAD}^+ \rightarrow \text{ADH} + \text{NAD}^+$ | $7,4 \times 10^1$ | aus Eintrag 5 und $K_m = 7,4 \times 10^{-5}$ | [103] |
| 14 | $\text{ADH-NADP}^+ \rightarrow \text{ADH} + \text{NADP}^+$ | $5,9 \times 10^1$ | aus Eintrag 5 und $K_m = 5,9 \times 10^{-5}$ | [104] |

* Bei 25°C

Wie erwartet, wurde NADPH kaum an die LDH gebunden. Holmberg *et al.* [105] machen hierfür einen Aspartatrest an der Position 52 auf der konservativen $\beta 1-\alpha A-\beta 2$ -Region verantwortlich, der die 2'-Phosphatgruppe des Adeninriboseringes sterisch hindert in der Coenzymregion der LDH zu binden.

Die Geschwindigkeitskonstanten mit denen sich die binären LDH-NADH/NAD⁺-Komplexe sowie die anderen Dehydrogenase-Coenzymkomplexe bilden, sind der Tabelle I zu entnehmen.

2.2. EINFLUSS DER DEHYDROGENASEN AUF DIE DURCH O₂ UND H₂O₂ INDUZIERT OXIDATION VON NADH ODER NADPH

Die Autoxidation von NADH und NADPH verlief unter normoxischen Bedingungen ([O₂] = 225 μ M) relativ langsam, wobei NADPH jedoch schneller als NADH oxidiert wurde (Abb. 3, Tabelle II, Einträge 1 und 2). Die höhere Reaktivität scheint in der höheren konformationellen Flexibilität des NADPHs begründet zu liegen [106].

Die Enzyme MDH, G6-PDH, GAPDH, LDH und AIDH (jeweils 10 μ M) verstärkten die Autoxidation des NADHs, wobei AIDH den stärksten Einfluss hatte (Abb. 3A-E, Tabelle II, Einträge 5-9). Für die GAPDH ist dies schon 1953 von Velick *et al.* [107] beschrieben worden. Vergleichbare Ergebnisse, ein Jahr später von Rafter *et al.* [108] bei pH 5,0, 5,3 und 5,7 erzielt, lassen auf die Beteiligung einer Perhydroxylradikal-vermittelten radikalischen Kettenreaktion schließen, die ca. 25 Jahre später von Chan & Bielski [91] entdeckt worden ist.

ADH, GIDH und ICDH hatten keinen Einfluss auf die Autoxidationsrate des Coenzym (Tabelle II, Eintrag 10). Die Autoxidation von NADPH wurde allein durch AIDH verstärkt (Abb. 3 F und Tabelle II, Eintrag 11). Katalase (130 U l⁻¹) verhinderte die Autoxidation von NADH und NADPH in keinem der Fälle, so dass eine Beteiligung von Wasserstoffperoxid ausgeschlossen werden konnte.

Allein in den Ansätzen mit LDH und NADH hemmte die SOD (50 U ml⁻¹) die Oxidation des NADHs beinahe vollständig (ohne Abbildung). Hier vermittelten hauptsächlich Superoxidanionen die NADH-Oxidation. Versuche unter hypoxischen Bedingungen (pO₂ \leq 4,7 hPa) verhinderten die Oxidation von NADH in Anwesenheit aller Dehydrogenasen komplett, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass in den Ansätzen mit MDH, G6-PDH, GAPDH und AIDH der molekulare Sauerstoff das alleinige beteiligte Oxidans gewesen ist.

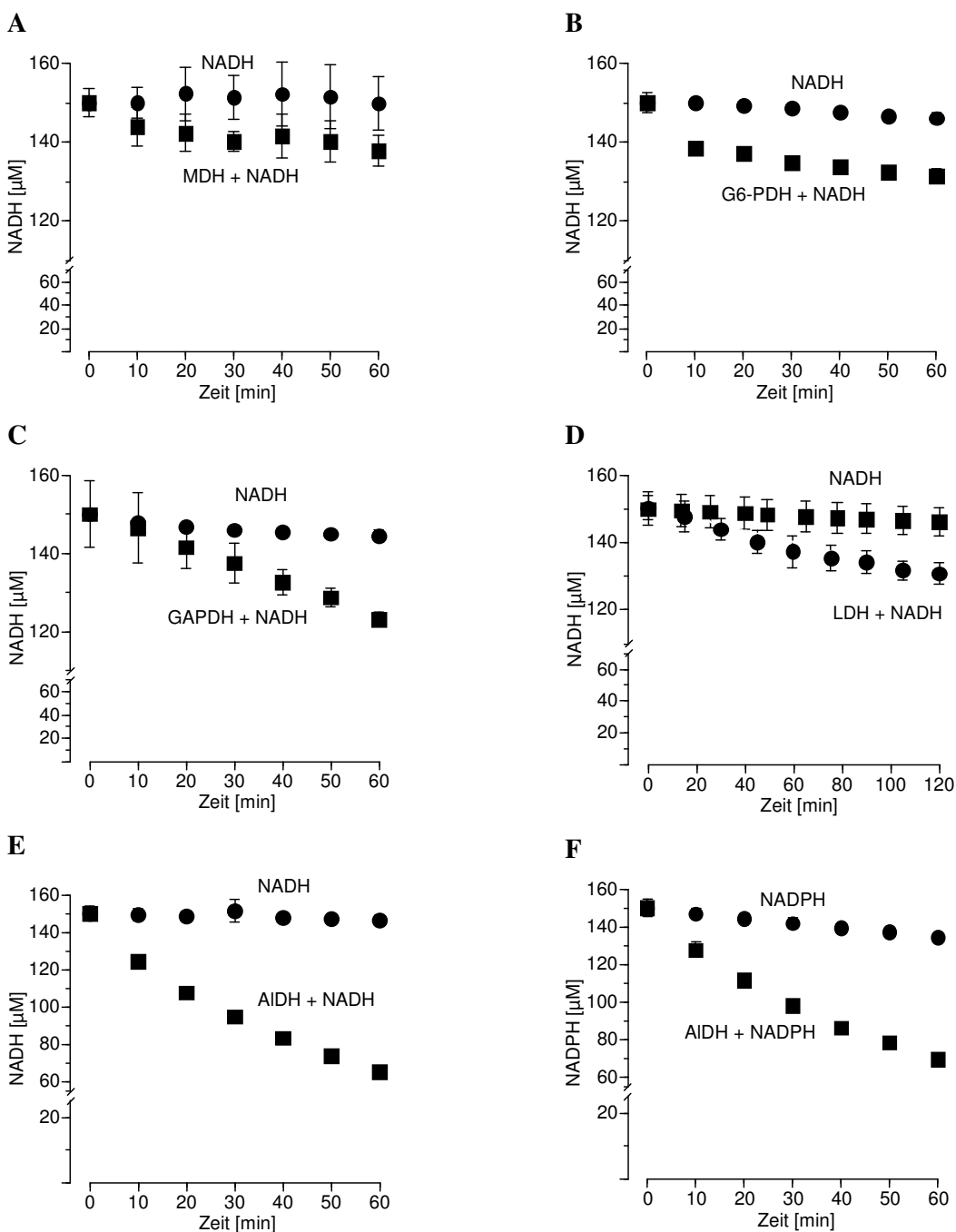


Abb. 3. Einfluss von Malat-Dehydrogenase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase und Aldehyd-Dehydrogenase auf die Autoxidation von NADH oder NADPH unter normoxischen Bedingungen ($[O_2] \approx 225 \mu M$). Die Pyridinnukleotide (jeweils $150 \mu M$) wurden in An- und Abwesenheit einer Dehydrogenase (je $10 \mu M$) in Phosphat-Puffer (50 mM , $\text{pH } 7,0$, 25°C (D) oder 37°C (A-C + E, F)), der den Übergangsmetallchelator Diethylentriaminpentaessigsäure ($100 \mu M$) enthielt, inkubiert. Die NADH- und NADPH-Oxidation wurde durch spektrophotometrische Messung der Abnahme der NADH- bzw. NADPH-Absorption bei 340 nm ermittelt. (A) Einfluss von Malat-Dehydrogenase (MDH), (B) Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6-PDH), (C) Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), (D) Lactat-Dehydrogenase (LDH) und (E) Aldehyd-Dehydrogenase (AIDH) auf die NADH-Autoxidation. (F) zeigt den Einfluss von Aldehyd-Dehydrogenase auf die NADPH-Autoxidation. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten; nicht sichtbare Standardabweichungen werden durch die Symbole verdeckt.

Die Oxidation von nicht gebundenem NADH und NADPH durch H_2O_2 (600 μM) verlief sehr langsam (Abb. 4, [109]). Aus den Daten von Bernofsky & Wanda [109] konnte für die Reaktion von NADH und H_2O_2 (Gleichung 18) eine Geschwindigkeitskonstante von $3,5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt werden, die auch für NADPH angenommen wurde (Tabelle II, Einträge 22 und 23).



Von den untersuchten Dehydrogenasen verstärkten allein ALDH und LDH die durch H_2O_2 induzierte Oxidation von NADH (Abb. 4 A und C, Tabelle II, Einträge 24 und 25), wobei wieder nur ALDH auch eine erhöhte NADPH-Oxidation verursachte (Abb. 4 B, Tabelle II, Eintrag 26). SOD (50 U ml^{-1}) konnte erneut die NADH-Oxidation in Anwesenheit von LDH nahezu komplett hemmen (ohne Abbildung), während sie die durch ALDH erhöhte Oxidation von NADH und NADPH wiederum nicht verhinderte.

Die Anwesenheit von ADH, G6-PDH, GLDH, GAPDH, ICDH oder MDH führte zu keinem detektierbaren Effekt auf die NAD(P)H-Oxidation (Tabelle II, Eintrag 27).

Da die SOD die durch O_2 und H_2O_2 vermittelte Oxidation des NADHs in Anwesenheit von LDH beinahe vollständig hemmte, deutete alles darauf hin, dass es sich auch hier um einen durch Superoxidanionen vermittelten Kettenreaktionsmechanismus (Gleichungen 15-17) handelte, der analog zu Gleichung 14 durch O_2 bzw. H_2O_2 initiiert wurde. Dieser Reaktionsmechanismus konnte durch kinetische Simulationen, basierend auf den bis *dato* bekannten Reaktionen reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffoxidspezies (118 Reaktionen [42]) sowie 21 weiteren, möglichen Reaktionen (Tabelle I, Einträge 1, 2, 5, 6 und Tabelle II, Einträge 1, 3, 5, 13, 15, 17, 19, 22, 24, 28, 31, 34, 36, 38, 40, 42, 44), plausibel gemacht werden. Die Simulationen stimmten gut mit den experimentell ermittelten Daten überein, wenn niedrige Geschwindigkeitskonstanten ($k = 1,6 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bzw. $2 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) für den Kettenstart zwischen LDH-NADH und O_2 bzw. H_2O_2 angenommen wurden (Tabelle II, Einträge 5 und 24). Diese Kettenstarts werden durch einen Ein-Elektronentransfer vom Enzym-gebundenen NADH auf das Oxidans ausgelöst, vergleichbar mit einer NADH- oder NADPH-Oxidase-Aktivität, die auch für andere Enzyme (z.B. Flavoenzyme [110]) beschrieben wurde.

Um nun ein deutlicheres Bild vom genauen Reaktionsverlauf und hinsichtlich der Gewichtung der beteiligten Teilreaktionen (139 Reaktionen) zu bekommen, wurde eine Sensitivitätsanalyse einschließlich einer Principal Component Analysis (PCA) der Sensitivitätsmatrix durchgeführt. Die Berechnungen der PCAs mit der ATROPOS-Software

ergaben, dass die experimentell gewonnenen Daten der Reaktionsansätze mit LDH-NADH und O_2 bzw. H_2O_2 schon durch 23 bzw. 18 Reaktionen ausreichend gut beschrieben werden können. Die beteiligten Einzelreaktionen sind zudem nach der Gewichtung ihrer Beteiligung sortiert worden (siehe Anhang: Tabelle IS und IIS). Beispielsweise ist die Kettenstartreaktion des binären LDH-NADH-Komplexes mit O_2 (Tabelle II, Eintrag 5) die wichtigste Reaktion bei der durch die LDH verstärkten Autoxidation von NADH, jedoch von untergeordneter Rolle in der Gegenwart von H_2O_2 . Nach den Kettenstartreaktionen ist die $O_2^{\bullet-}$ -vermittelte Kettenreaktion in beiden Fällen der wichtigste Reaktionsschritt, was experimentell durch den starken Einfluss der SOD belegt wurde.

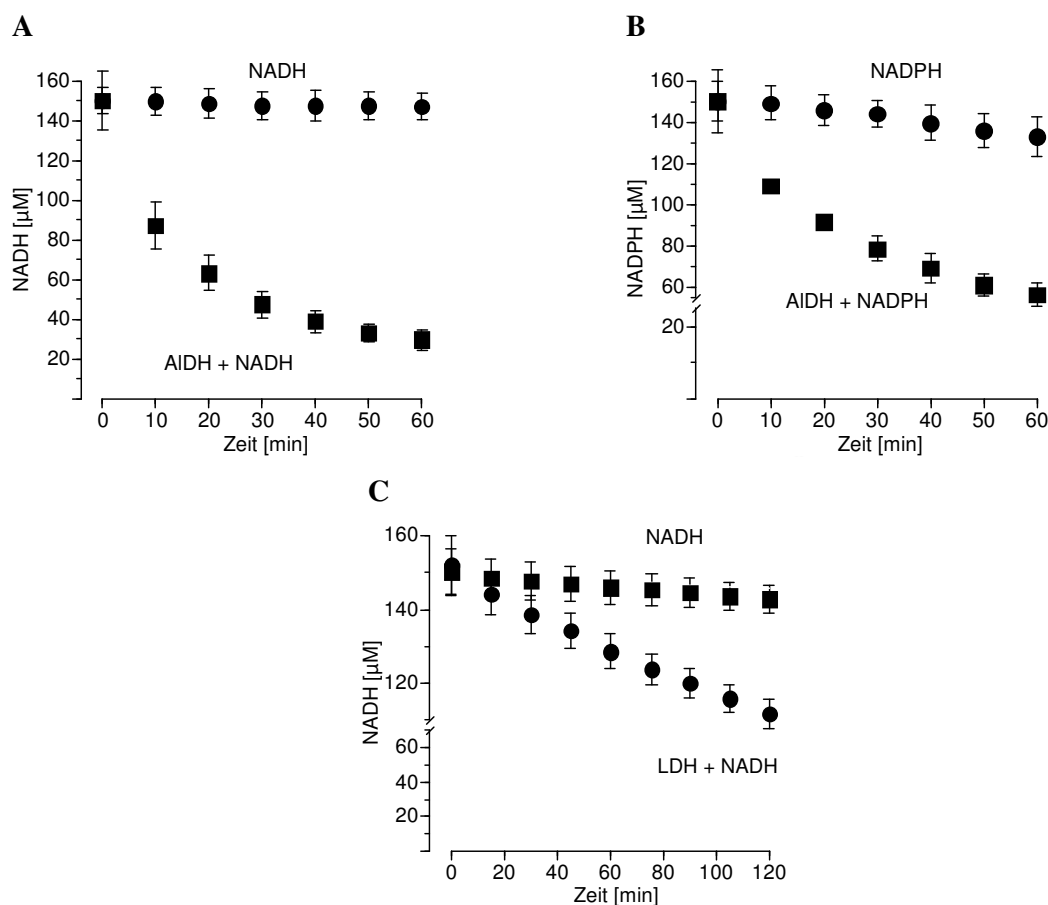


Abb. 4. Einfluss von Aldehyd-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase auf die Oxidation von NADH bzw. NADPH durch Wasserstoffperoxid. NADH und NADPH (je 150 μM) wurden mit Wasserstoffperoxid (600 μM) unter normoxischen Bedingungen in An- und Abwesenheit von Aldehyd-Dehydrogenase (AIDH, 10 μM) oder Lactat-Dehydrogenase (LDH, 10 μM) in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0, 25°C (C) oder 37°C (A, B)) inkubiert, dem der Übergangsmetallchelator Diethylentriaminpentaessigsäure (100 μM) zugesetzt worden ist. Die NAD(P)H-Oxidation wurde durch spektrophotometrische Messungen der Abnahme der NAD(P)H-Absorption bei 340 nm ermittelt. (A) Einfluss von Aldehyd-Dehydrogenase auf die durch Wasserstoffperoxid verursachte Oxidation von NADH und (B) von NADPH. (C) zeigt den Einfluss von Lactat-Dehydrogenase auf die durch Wasserstoffperoxid verursachte NADH-Oxidation. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten; nicht sichtbare Standardabweichungen werden durch die Symbole verdeckt.

2. Ergebnisse

Tabelle II. Reaktionen und Geschwindigkeitskonstanten der NAD(P)H-Oxidation in An- und Abwesenheit von Dehydrogenasen

| Eintrag | Reaktion | k [$M^{-1} s^{-1}$]* | k_{virt} [$M^{-1} s^{-1}$]* | Bemerkungen | Lit. |
|---------|---|--------------------------|---------------------------------|--|-------|
| 1 | $NADH + O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O_2^{\ddagger}$ | $3,0 \times 10^{-6*}$ | | | [111] |
| 2 | $NADPH + O_2 \rightarrow NADP^+ + H_2O_2^{\ddagger}$ | $2,3 \times 10^{-5*}$ | | | [111] |
| 3 | $NADH + H_3O^+ \rightarrow HNADH^+ + H_2O$ | 7,0 | | $k_1 = 5,6 \times 10^{-5} s^{-1}$ bei pH 5,1 und $k_1 = 5,9 \times 10^{-4} s^{-1}$ bei pH 4,1 | [112] |
| 4 | $NADPH + H_3O^+ \rightarrow HNADPH^+ + H_2O$ | 7,0 | | Annahme: identisch mit Eintrag 3 | |
| 5 | $LDH-NADH + O_2 \rightarrow LDH-NAD^{\bullet} + H^+ + O_2^{\bullet-}$ | | $1,6 \times 10^{-4}$ | angenommene $[O_2] = 225 \mu M$ | |
| 6 | $MDH-NADH + O_2 \rightarrow MDH-NAD^{\bullet} + H^+ + O_2^{\bullet-}$ | | $7,0 \times 10^{-2}$ | angenommene $[O_2] = 225 \mu M$ | |
| 7 | $G6-PDH-NADH + O_2 \rightarrow G6-PDH-NAD^{\bullet} + H^+ + O_2^{\bullet-}$ | | $1,0 \times 10^{-1}$ | angenommene $[O_2] = 225 \mu M$ | |
| 8 | $GAPDH-NADH + O_2 \rightarrow GAPDH-NAD^{\bullet} + H^+ + O_2^{\bullet-}$ | | $7,0 \times 10^{-1}$ | angenommene $[O_2] = 225 \mu M$ | |
| 9 | $AIDH-NADH + O_2 \rightarrow AIDH-NAD^{\bullet} + H^+ + O_2^{\bullet-}$ | | 2,0 | angenommene $[O_2] = 225 \mu M$ | |
| 10 | $Enzyme-NADH + O_2 \rightarrow Enzyme-NAD^{\bullet} + H^+ + O_2^{\bullet-}$ | | $\leq 3,0 \times 10^{-5*}$ | angenommene $[O_2] = 225 \mu M$ Enzyme = ADH, GIDH, ICDH | |
| 11 | $AIDH-NADPH + O_2 \rightarrow AIDH-NADP^{\bullet} + H^+ + O_2^{\bullet-}$ | | 1,5 | angenommene $[O_2] = 225 \mu M$ | |
| 12 | $Enzyme-NADPH + O_2 \rightarrow Enzyme-NADP^{\bullet} + H^+ + O_2^{\bullet-}$ | | $\leq 2,3 \times 10^{-5*}$ | angenommene $[O_2] = 225 \mu M$ Enzyme = MDH, G6-PDH, ADH, GIDH, ICDH, GAPDH | |
| 13 | $NADH + O_2^{\bullet-} \rightarrow NAD^{\bullet} + HOO^-$ | 2,7 | | $k_4 \ll 27 M^{-1} s^{-1}$ | [69] |
| 14 | $NADPH + O_2^{\bullet-} \rightarrow NADP^{\bullet} + HOO^-$ | 2,7 | | Annahme: identisch mit Eintrag 13 | |
| 15 | $LDH-NADH + O_2^{\bullet-} \rightarrow LDH-NAD^{\bullet} + HOO^-$ | $3,6 \times 10^4$ | | | [87] |
| 16 | $Enzyme-NAD(P)H^{\ddagger} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Enzyme-NAD(P)^{\bullet} + HOO^-$ | | $\leq 2,7$ | | |
| 17 | $NADH + HO_2^{\bullet} \rightarrow NAD^{\bullet} + H_2O_2$ | $1,8 \times 10^5$ | | | [88] |
| 18 | $NADPH + HO_2^{\bullet} \rightarrow NADP^{\bullet} + H_2O_2$ | $1,8 \times 10^5$ | | Annahme: identisch mit Eintrag 17 | |
| 19 | $LDH-NADH + HO_2^{\bullet} \rightarrow LDH-NAD^{\bullet} + H_2O_2$ | $2,0 \times 10^6$ | | | [88] |
| 20 | $GAPDH-NADH + HO_2^{\bullet} \rightarrow GAPDH-NAD^{\bullet} + H_2O_2$ | $2,0 \times 10^7$ | | | [91] |
| 21 | $Enzyme-NAD(P)H^{\ddagger} + HO_2^{\bullet} \rightarrow Enzyme-NAD(P)^{\bullet} + H_2O_2$ | | $\leq 1,8 \times 10^5$ | Enzyme = MDH, G6-PDH, ICDH, AIDH, ADH, GIDH | |

2. Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle II. Reaktionen und Geschwindigkeitskonstanten der NAD(P)H-Oxidation in An- und Abwesenheit von Dehydrogenasen

| Eintrag | Reaktion | k [$M^{-1} s^{-1}$]* | k_{virt} [$M^{-1} s^{-1}$]* | Bemerkungen | Lit. |
|---------|---|--------------------------|---------------------------------|---|-------|
| 22 | $NADH + H_2O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O + HO^-$ | $3,5 \times 10^{-5}$ | | abgeleitet aus Daten in [109] | |
| 23 | $NADPH + H_2O_2 \rightarrow NADP^+ + H_2O + HO^-$ | $3,5 \times 10^{-5}$ | | Annahme: identisch mit Eintrag 22 | |
| 24 | $LDH-NADH + H_2O_2 \rightarrow \text{Produkt, das } O_2^{\bullet-} \text{ bildet}$ | | $2,0 \times 10^{-4}$ | | |
| 25 | $AIDH-NADH + H_2O_2 \rightarrow \text{Produkte}$ | | 0,33 | | |
| 26 | $AIDH-NADPH + H_2O_2 \rightarrow \text{Produkte}$ | | 0,33 | | |
| 27 | $\text{Enzyme-NAD(P)H}^{\ddagger} + H_2O_2 \rightarrow \text{Produkte}$ | | $\leq 3,5 \times 10^{-5}$ | Enzyme = MDH, G6-PDH, GAPDH, ADH, ICDH, GIDH | |
| 28 | $NADH + HNO_2 \rightarrow NAD^{\bullet} + \bullet NO + H_2O$ | | 10 | | |
| 29 | $NADPH + HNO_2 \rightarrow NADP^{\bullet} + \bullet NO + H_2O$ | | 10 | Annahme: identisch mit Eintrag 28 | |
| 30 | $ADH-NADH + HNO_2 \rightarrow ADH-NAD^{\bullet} + \bullet NO + H_2O$ | | 370 | | |
| 31 | $LDH-NADH + HNO_2 \rightarrow LDH-NAD^{\bullet} + \bullet NO + H_2O$ | | 520 | | |
| 32 | $ADH-NADPH + HNO_2 \rightarrow ADH-NADP^{\bullet} + \bullet NO + H_2O$ | | ≤ 10 | | |
| 33 | $\text{Enzyme-NAD(P)H}^{\ddagger} + HNO_2 \rightarrow \text{Enzyme-NAD(P)}^{\bullet} + \bullet NO + H_2O$ | | ≤ 10 | Enzyme = MDH, G6-PDH, GAPDH, AIDH, ICDH, GIDH | |
| 34 | $NADH + ONOOH \rightarrow NAD^{\bullet} + H_2O + \bullet NO_2$ | $7,4 \times 10^3$ | | | [113] |
| 35 | $NADPH + ONOOH \rightarrow NADP^{\bullet} + H_2O + \bullet NO_2$ | $\geq 7,4 \times 10^3$ | | Annahme: nahezu identisch mit Eintrag 34 | |
| 36 | $NADH + O_2NOOH \rightarrow NAD^+ + H_2O_2 + \bullet NO_2$ | $1,0 \times 10^4$ | | | [114] |
| 37 | $NADPH + O_2NOOH \rightarrow NADP^+ + H_2O_2 + \bullet NO_2$ | $\geq 1,0 \times 10^4$ | | Annahme: nahezu identisch mit Eintrag 36 | |
| 38 | $NADH + \bullet NO_2 \rightarrow NAD^{\bullet} + HNO_2$ | $4,0 \times 10^3$ | | | [115] |
| 39 | $NADPH + \bullet NO_2 \rightarrow NADP^{\bullet} + HNO_2$ | $\geq 4,0 \times 10^3$ | | Annahme: nahezu identisch mit Eintrag 38 | |

2. Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle II. Reaktionen und Geschwindigkeitskonstanten der NAD(P)H-Oxidation in An- und Abwesenheit von Dehydrogenasen

| Eintrag | Reaktion | k [M ⁻¹ s ⁻¹]* | k_{virt} [M ⁻¹ s ⁻¹]* | Bemerkungen | Lit. |
|---------|--|---|--|--|------|
| 40 | $\text{NAD}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{O}_2^{\bullet-}$ | $2,0 \times 10^9$ | | | [69] |
| 41 | $\text{NADP}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{O}_2^{\bullet-}$ | $2,0 \times 10^9$ | | Annahme: identisch mit Eintrag 40 | |
| 42 | $\text{LDH-NAD}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{LDH-NAD}^+ + \text{O}_2^{\bullet-}$ | $3,2 \times 10^9$ | | | [88] |
| 43 | $\text{Enzyme-NAD(P)}^{\bullet\ddagger} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Enzyme-NAD(P)}^+ + \text{O}_2^{\bullet-}$ | $\approx 2,0 \times 10^9$ | | Annahme: nahezu identisch mit Eintrag 40 Enzyme = MDH, G6-PDH, ICDH, GAPDH, AIDH, ADH, GIDH | |
| 44 | $2 \text{NAD}^\bullet \rightarrow (\text{NAD})_2$ | $5,6 \times 10^7$ | | | [87] |
| 45 | $2 \text{NADP}^\bullet \rightarrow (\text{NADP})_2$ | $5,6 \times 10^7$ | | Annahme: identisch mit Eintrag 44 | |

* Bei 25°C

* dargestellt als Reaktion 1. Ordnung in [s⁻¹]

k_{virt} . Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte Geschwindigkeitskonstanten. Um die Geschwindigkeitskonstanten zu bestimmen, wurden kinetische Simulationen unter Verwendung von Reaktionen und Geschwindigkeitskonstanten aus Tabelle I und II sowie der Literatur [42, 116] mit dem KINTECUS V3.8 Programm von Dr. James C. Ianni [117] an die experimentell gewonnenen Daten angepasst.

† Die in Eintrag 1 dargestellte Reaktion wurde von Yokota und Yamazaki [118] vorgeschlagen. Es ist wahrscheinlicher, dass die Autoxidation von NAD(P)H zu NAD(P)[•] und O₂^{•-} führt, wofür jedoch bisher jeglicher experimenteller Beweis fehlt.

$k_1 = k_2 \times [\text{H}^+]$ und Umformung führt zu

$$k_2 = \frac{k_1}{[\text{H}^+]} \quad \text{d.h.} \quad k_2 = \frac{5,6 \times 10^{-5}}{7,94 \times 10^{-6}} = 7,05 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ bei pH 5.1.}$$

‡ Die Bezeichnung NAD(P)H zeigt an, dass beide Coenzyme, d.h. NADH und NADPH, auf ihre Fähigkeit mit den ausgesuchten Oxidantien zu reagieren, untersucht wurden.

2.3. EINFLUSS DER DEHYDROGENASEN AUF DIE DURCH HNO_2 INDUZIERTE OXIDATION VON NADH ODER NADPH

HNO_2 , generiert durch Zugabe von 10 mM Natriumnitrit zu dem Versuchspuffer (Phosphat-Puffer 50 mM, pH 7,0, 37°C), verursachte nur eine langsame, lineare Oxidation von NADH und NADPH (Abb. 5, Tabelle II, Einträge 28 und 29). ADH und LDH verstärkten signifikant die NADH-Oxidation (Abb. 5 A, B), nicht aber die NADPH-Oxidation (ohne Abbildung).

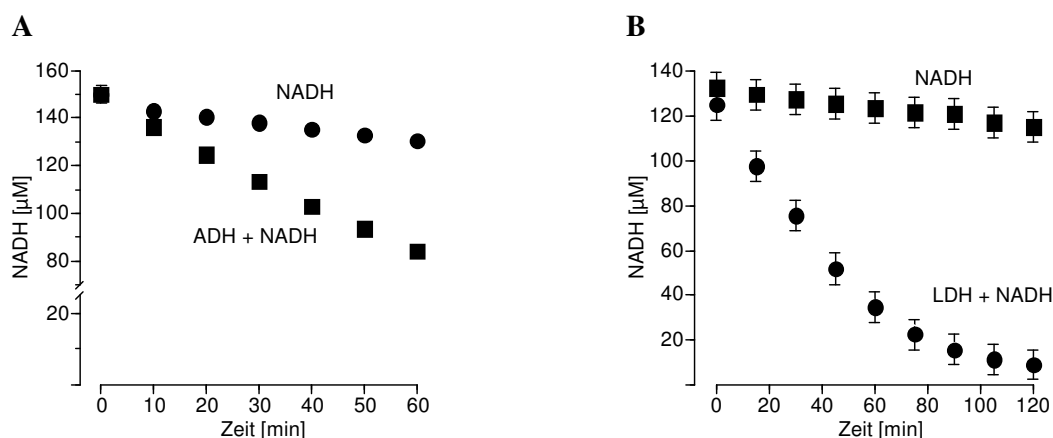


Abb. 5. Einfluss von Alkohol-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase auf die Oxidation von NADH durch HNO_2 . NADH (150 μM) wurde in An- und Abwesenheit von Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und Lactat-Dehydrogenase (LDH, je 10 μM) unter normoxischen Bedingungen in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0, 25°C (B) bzw. 37°C (A)) mit dem Übergangsmetallchelator Diethylentriaminpentaessigsäure (100 μM) inkubiert. Zu diesem Ansatz wurde NaNO_2 (10 mM) pipettiert, aus dem sich in wässrigen Lösungen HNO_2 bildet. Die NADH-Oxidation wurde durch die spektrophotometrische Messung der Abnahme der NADH-Absorption bei 340 nm bestimmt. (A) Einfluss von Alkohol-Dehydrogenase und (B) Lactat-Dehydrogenase auf die HNO_2 -induzierte NADH-Oxidation. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten; nicht sichtbare Standardabweichungen werden durch die Symbole verdeckt.

Experimente mit SOD und Versuche unter hypoxischen Bedingungen ($\text{pO}_2 \leq 4,7$ hPa) zeigten, dass ADH-gebundenes NADH ausschließlich durch HNO_2 (Tabelle II, Eintrag 30) und nicht durch $\text{O}_2^{\bullet-}$ oxidiert wurde. Im Gegensatz dazu konnte SOD die Oxidation in Anwesenheit von LDH weitgehend hemmen (ohne Abbildung), was wiederum für einen langsamen Kettenstart mit HNO_2 und eine schnellere Kettenreaktion mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ als Kettenträger sprach. Die experimentell gewonnenen Daten konnten hervorragend simuliert werden, wenn für den Kettenstart zwischen LDH-NADH und HNO_2 eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 520 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabelle II, Eintrag 31) und eine anschließende Kettenreaktion mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ als Kettenträger angenommen wurde.

Alle anderen Dehydrogenasen hatten keinen Einfluss auf die Oxidation der Pyridinnucleotide in Anwesenheit von HNO_2 (Tabelle II, Eintrag 33).

Eine Beteiligung von Nitrit (NO_2^-) an der Oxidation von NADH, obwohl von allen Stickstoffoxiden in den höchsten Konzentrationen im Reaktionsansatz vorhanden (siehe 5.2.4.), kann generell ausgeschlossen werden, da die Reaktionen extrem pH-Wert anfällig sind. So verläuft die NADH Oxidation in Anwesenheit von z.B. LDH bei pH 7,0 vielfach schneller als bei pH 7,5 (ohne Abbildung).

2.4. EINFLUSS DER DEHYDROGENASEN AUF DIE DURCH SIN-1 INDUZIERTER OXIDATION VON NADH ODER NADPH

3-Morpholinosydnomin (SIN-1), ein Zerfallsprodukt des Medikamentenwirkstoffs Molsidomin, wird oft in experimentellen Systemen für die *in situ*-Generierung stöchiometrischer Peroxynitritkonzentrationen verwendet [65, 119, 120]. In wässrigen Lösungen zerfällt SIN-1 bei neutralem pH mit $t_{1/2} = 40$ Minuten [121], wobei SIN-1A entsteht [122], das in Gegenwart von O_2 spontan zu SIN-1C, Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$) und $\text{O}_2^{\cdot-}$ zerfällt. $\cdot\text{NO}$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$ reagieren diffusionskontrolliert ($k = 6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [18]) weiter zu Peroxynitrit.

Die Oxidation von freiem NADH und NADPH (jeweils $150 \mu\text{M}$) durch SIN-1 (1 mM) verlief wesentlich schneller als die Autoxidation oder die durch H_2O_2 verursachte Oxidation der Pyridinnucleotide (Abb. 6; vergleiche mit Abb. 3 und 4). LDH ($10 \mu\text{M}$) beschleunigte die SIN-1-abhängige Oxidation von NADH um das siebenfache, während die NADPH-Oxidation durch die Lactat-Dehydrogenase sogar leicht verzögert wurde (Abb. 6 A). Da $10 \mu\text{M}$ LDH, die unter den gegebenen experimentellen Bedingungen $28 \mu\text{M}$ NADH binden (s. Abb. 2), innerhalb der ersten 20 Minuten nach Zugabe von SIN-1 eine Oxidation von $105 \mu\text{M}$ NADH bewirkten, muss das Coenzym ca. viermal an der Coenzymbindungsstelle ausgetauscht worden sein.

SOD (50 U ml^{-1}) verhinderte die durch SIN-1 induzierte NADH-Oxidation sowohl in An- als auch Abwesenheit von LDH nahezu komplett (Abb. 6 B). Dies ist zum einen dadurch zu erklären, dass die direkt beim Zerfall von SIN-1 freigesetzten Superoxidanionen durch die SOD dismutiert wurden, wodurch es zu einer verringerten Bildung von Peroxynitrit kam, zum anderen durch den Umsatz der Superoxidanionen, die aus der Reaktion des noch gebildeten Peroxynitrits mit freiem NADH resultierten [65, 113, 123, 124]. Folglich verminderte SOD

den Kettenstart, d.h. den Superoxid-generierenden Angriff von Peroxynitrit auf NADH, und beendete zudem die Kettenreaktion.

Die Möglichkeit, dass Superoxidanionen, die direkt aus dem SIN-1-Zerfall resultierten, das LDH-gebundene NADH oxidiert haben, ist ziemlich unwahrscheinlich, da SIN-1 zusätzlich äquimolare Mengen an $\bullet\text{NO}$ freisetzt, das, wie bereits oben angegeben, mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ diffusionskontrolliert zu Peroxynitrit reagiert. Die Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation von LDH-gebundenem NADH durch Superoxid ist jedoch wesentlich (2×10^5 -mal) geringer (Tabelle II, Eintrag 15). Berücksichtigt man, dass unter den experimentellen Bedingungen 28 μM NADH an der LDH gebunden vorliegen, lässt sich berechnen, dass subnanomolare $\bullet\text{NO}$ -Konzentrationen mit dem binären LDH-NADH-Komplex um Superoxid konkurrieren können ($[\bullet\text{NO}] = ([\text{LDH-NADH}] \times 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}) / (6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}) = 0,15 \text{ nM}$). Die in Anwesenheit von $\bullet\text{NO}$ verbleibende Superoxidkonzentration ($\leq 0,15 \text{ nM}$) ist vermutlich zu gering, um die Kettenreaktion zu tragen (Gleichung 17).

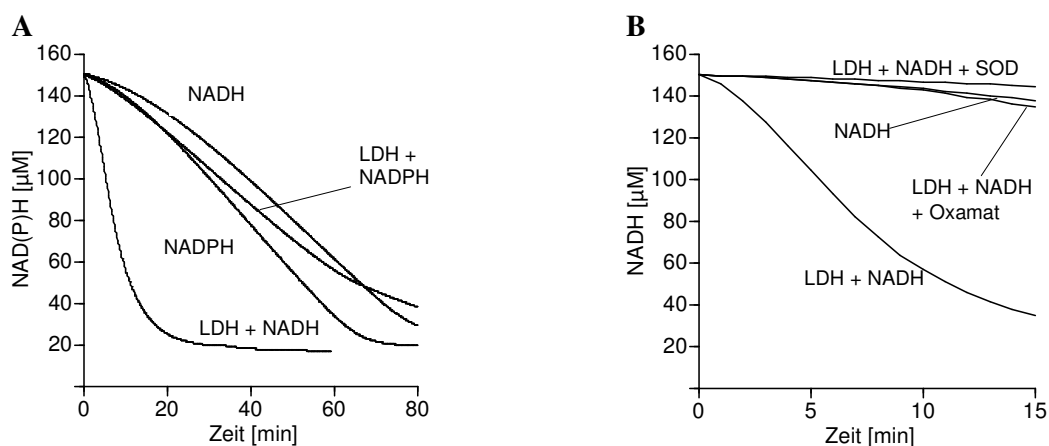


Abb. 6. Einfluss der Lactat-Dehydrogenase auf die durch SIN-1 induzierte Oxidation von NADH und NADPH. (A) NADH oder NADPH (jeweils 150 μM) wurden in An- und Abwesenheit von Lactat-Dehydrogenase (LDH, 10 μM) in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 25°C) inkubiert, der den Übergangsmetallchelator Diethylentriaminpentaessigsäure (100 μM) und 3-Morpholinocarbonyl-L-histidin (SIN-1, 1 mM) enthielt. (B) Einfluss von Superoxid-Dismutase (SOD, 50 U ml^{-1}) und des kompetitiven LDH-Inhibitors Oxamat (1 mM) auf die durch SIN-1 induzierte Oxidation von NADH; die experimentellen Bedingungen waren mit (A) identisch. Die NADH- und NADPH-Oxidation wurde durch spektrophotometrische Messungen der Extinktionsabnahme bei 340 nm bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Um nachzuweisen, dass die Bindung des NADHs an die Coenzymbindungsstelle von entscheidender Bedeutung für die gesteigerte Oxidation in der Gegenwart von LDH ist, wurden Experimente mit dem Substratanalogon Oxamat durchgeführt [94, 125]. Oxamat bildet mit NADH und LDH einen ternären Komplex, der nicht wieder dissoziiert. Hierbei

bleiben die aktiven Zentren des LDH-Tetramers dauerhaft verschlossen [94], so dass das gebundene NADH vom Medium und damit vor Oxidantien sterisch abgeschirmt ist. Wie erwartet, verhinderte Oxamat die durch die LDH verstärkte Oxidation des Coenzym (Abb. 6 B). Die Oxidation von nicht gebundenem NADH und von NADPH wurde durch Oxamat nur leicht vermindert (ohne Abbildung), was darauf hindeutet, dass Oxamat kein effektiver Peroxynitritfänger oder Fänger anderer von SIN-1 freigesetzter Radikale ist. Alle anderen untersuchten Dehydrogenasen verstärkten die durch SIN-1 ausgelöste NADH-Oxidation in keiner Weise. Einige Enzyme verminderten sogar die Oxidation von NADH und auch von NADPH (Tabelle III), was darauf hindeutet, dass der Proteinteil der Enzyme sehr schnell mit den freigesetzten Radikalen reagierte (s. 1.2.6.).

2.5. EINFLUSS DER DEHYDROGENASEN AUF DIE DURCH AUTHENTISCHES PEROXYNITRIT INDUZIERTER OXIDATION VON NADH ODER NADPH

Auch in Versuchen mit authentischem Peroxynitrit zeigten alle Dehydrogenasen, mit Ausnahme der LDH, keine die Oxidation von NADH und/oder NADPH verstärkende Wirkung. Vielmehr verminderten auch hier einige Enzyme die Coenzym-Oxidation erheblich (Tabelle IV), was wiederum auf die schnelle Reaktion von Peroxynitrit mit einigen der Proteinseitenketten hindeutete. Auch LDH verringerte die Oxidation von NADPH durch Peroxynitrit (um circa 60 %). Wie in den Versuchen mit SIN-1 wurde die NADH-Oxidation in Gegenwart von LDH verstärkt (Abb. 7 A), jedoch in deutlich geringerem Ausmaß.

Da freies NADH und NADPH in nahezu gleichem Umfang durch Peroxynitrit oxidiert wurden, konnte der prooxidative Einfluss der LDH auf ihr Coenzym (NADH) um ihre Fängereigenschaften anhand ihres Effekts auf die NADPH-Oxidation korrigiert werden. Hieraus resultierte, dass die LDH den Betrag des oxidierten NADHs ungefähr verdoppelte. In Anwesenheit von LDH und SOD (50 U ml^{-1}) oder Oxamat (1 mM) wurden NADH und NADPH in gleichem Umfang oxidiert (Abb. 7 B, C), was darauf schließen lässt, dass die durch die LDH erhöhte NADH-Oxidation wiederum über eine durch Superoxidanionen vermittelte Kettenreaktion mit Beteiligung des aktiven Zentrums verlief. Dies steht zunächst scheinbar im Widerspruch zu früheren Arbeiten, da dort aus der Reaktion von Peroxynitrit mit NADH nur geringe Mengen an Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid resultierten [113], obwohl freies NADH und NADPH sehr stark durch Peroxynitrit oxidiert wurde und somit eine erhebliche Superoxidanionbildung – aufgrund der Reduktion molekularen

Sauerstoffs durch NAD^\bullet – zu erwarten gewesen wäre. Eine naheliegende Erklärung ist die Reduktion des ebenfalls entstehenden $\bullet\text{NO}_2$ durch Proteinseitenketten der LDH. Zudem führte

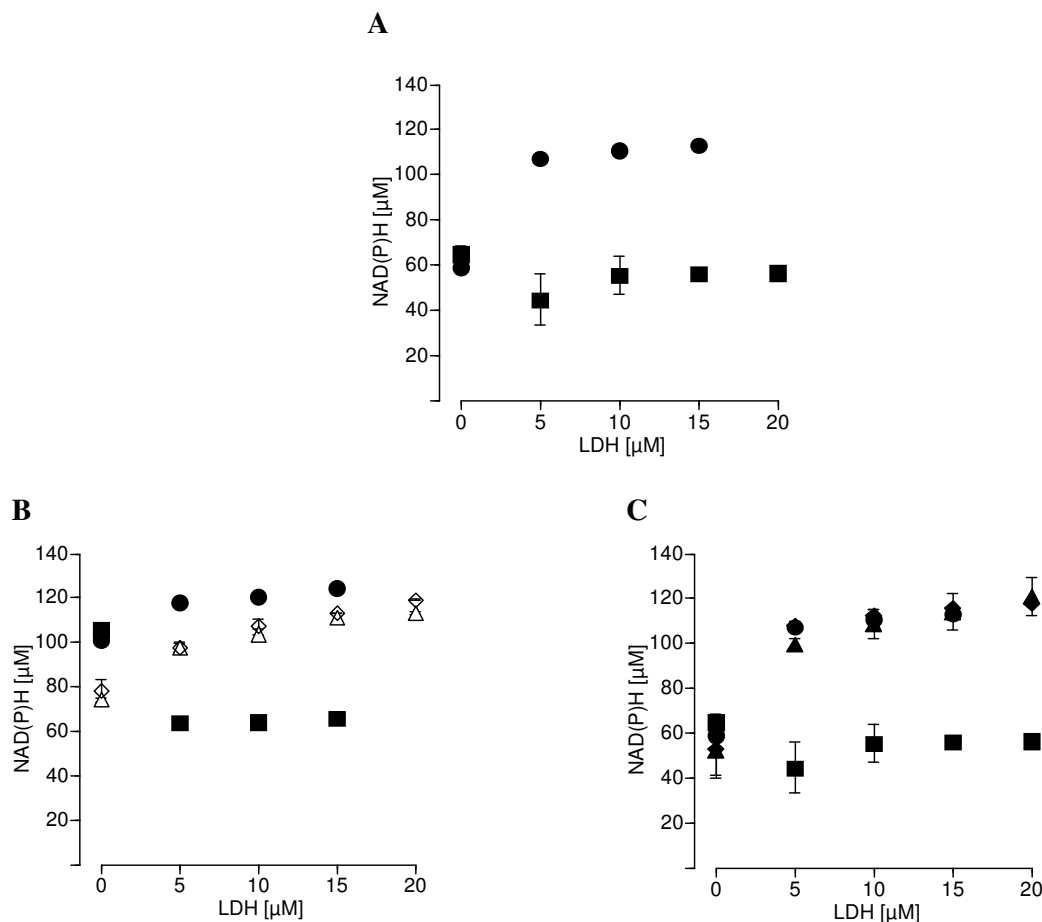


Abb. 7. Einfluss der Lactat-Dehydrogenase auf die durch authentisches Peroxynitrit induzierte Oxidation von NADH und NADPH. NADH oder NADPH (jeweils 150 μM) wurden in An- und Abwesenheit von Lactat-Dehydrogenase (LDH, 5-20 μM) in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 25°C) inkubiert. (A) Einfluss von Lactat-Dehydrogenase auf die durch authentisches Peroxynitrit (280 μM) induzierte Oxidation von NADH oder NADPH. (B) Einfluss von Superoxid-Dismutase (50 U ml^{-1}) auf die durch Peroxynitrit (100 μM) induzierte Oxidation von NADH und NADPH in An- und Abwesenheit von Lactat-Dehydrogenase. (C) Einfluss des kompetitiven Lactat-Dehydrogenase Inhibitors Oxamat (1 mM) auf die durch Peroxynitrit (280 μM) induzierte Oxidation von NADH und NADPH in An- und Abwesenheit von Lactat-Dehydrogenase. Die NADH- und NADPH-Oxidation wurde 5 Minuten nach Zugabe von Peroxynitrit spektrophotometrisch durch die Messung der Absorptionsabnahme bei 340 nm erfasst. Längere Inkubationen mit Peroxynitrit führten zu keiner zusätzlichen NADH- oder NADPH-Oxidation. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten; nicht sichtbare Standardabweichungen werden durch die Symbole verdeckt. ■ = LDH + NADH, ● = LDH + NADPH, Δ = LDH + NADH + SOD, \diamond = LDH + NADPH + SOD, \blacktriangle = LDH + NADH + Oxamat, \blacklozenge = LDH + NADPH + Oxamat.

die Reaktion von Peroxynitrit mit NADH zur Bildung der reaktiven Intermediate Superoxid und $\bullet\text{NO}_2$ [65, 124], die zumindest in Abwesenheit von LDH nahezu diffusionskontrolliert zu Peroxynitrat (O_2NOO^-) reagierten, das nicht in der Lage ist, NADH unter physiologischen pH-Werten zu oxidieren [124]. Aufgrund der hohen LDH Konzentration (10 μM) im

Vergleich zur Konzentration des Superoxidanions ($0,02 \mu\text{M}$; berechnet durch die kinetischen Simulationen), kann das Enzym mit dem Superoxidanion um das $\bullet\text{NO}_2$ konkurrieren.

Unter der Annahme von 42 Tyrosinresten pro LDH-Molekül [126] und einer Geschwindigkeitskonstante von $k = 3,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [127] für die Oxidation des Peptid-gebundenen Tyrosins durch $\bullet\text{NO}_2$, ergab sich eine Geschwindigkeitskonstante von $1,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die Reaktion von LDH mit $\bullet\text{NO}_2$. Der relative Anteil des durch die LDH abgefangenen $\bullet\text{NO}_2$ betrug 1,5/1: $(10 \mu\text{M} \times 1,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}) / (0,02 \mu\text{M} \times 4,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$. Demnach wurden 67 % des $\bullet\text{NO}_2$ durch die LDH abgefangen, so dass die Konzentration des Superoxidanions ausreichend groß wurde, um den Kettenstart sowie insbesondere die Kettenreaktion des LDH-gebundenen NADHs zu tragen (Gleichungen 14-17). Diese Erwägungen berücksichtigen allerdings nicht, dass aus sterischen Gründen wahrscheinlich nicht alle Tyrosinreste mit $\bullet\text{NO}_2$ reagierten. Andererseits besitzt die LDH zusätzliche Aminosäurereste wie Tryptophane und Cysteine, die ebenfalls schnell mit $\bullet\text{NO}_2$ reagieren können.

In Abwesenheit von LDH konnte die durch Peroxynitrit ($100 \mu\text{M}$) vermittelte Bildung von NAD^+ ($43,2 \pm 2,0 \mu\text{M}$; siehe auch Abb. 7B) zufriedenstellend durch kinetische Simulationen mit dem KINTECUS V3.8 Programm ($41,3 \mu\text{M}$) vorausgesagt werden. Die PCA reduzierte das vollständige Kinetikschema auf 44 Reaktionen (Tabelle IIIS) und besagte, dass die nicht gebundenen Coenzyme hauptsächlich durch Peroxysalpetrige Säure (ONOOH , $B_r = 6514,3$) und kaum durch die von ihr freigesetzten Radikale oxidiert wurden, was den Ergebnissen von Kirsch *et al.* [113] entspricht. In Anwesenheit von LDH war es jedoch nicht möglich die Experimente mit authentischem sowie *in situ* generiertem Peroxynitrit (SIN-1) zu simulieren. Es ist anzunehmen, dass dies an den bisher noch unbekannten Fängereigenschaften der Lactat-Dehydrogenase lag, die besonders offenkundig in den Experimenten mit authentischem Peroxynitrit waren (Abbildung 7 A). Der im Vergleich zu den Versuchen mit SIN-1 nur geringe Effekt der LDH auf die Oxidation von NADH durch authentisches Peroxynitrit ist vermutlich auch darin begründet, dass das Enzym in bedeutendem Maße mit Radikalen und reaktiven Spezies (z.B. ONOOH , $\text{HO}\bullet$, $\bullet\text{NO}_2$) reagierte.

2. Ergebnisse

Tabelle III. SIN-1-abhängige Oxidation von NAD(P)H in An- und Abwesenheit von Dehydrogenasen

| Reaktionsansatz | | NADH [μM] | Reaktionsansatz | | NADPH [μM] |
|-----------------|----------------------|------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|
| NADH | (150 μM) | 118 ± 3 | NADPH | (150 μM) | 108 ± 4 |
| + ADH | (10 μM) | 133 ± 1 | + ADH | (10 μM) | 130 ± 1 |
| + AlDH | (10 μM) | 95 ± 5 | + AlDH | (10 μM) | 94 ± 2 |
| + G6-PDH | (10 μM) | 130 ± 4 | + G6-PDH | (10 μM) | 128 ± 1 |
| + GlDH | (10 μM) | 116 ± 3 | + GlDH | (10 μM) | 112 ± 1 |
| + GAPDH | (10 μM) | 140 ± 1 | + GAPDH | (10 μM) | 146 ± 1 |
| + ICDH | (10 μM) | 120 ± 2 | + ICDH | (10 μM) | 113 ± 1 |
| + MDH | (10 μM) | 141 ± 1 | + MDH | (10 μM) | 136 ± 1 |

NADH oder NADPH (150 μM) wurde in An- und Abwesenheit von Dehydrogenasen (10 μM) für 30 Minuten mit SIN-1 (1 mM) in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 25°C) inkubiert. Die NAD(P)H-Oxidation wurde durch spektrophotometrische Messungen der Extinktionsabnahme bei 340 nm in Doppelansätzen bestimmt. Dargestellt ist die im Versuchsansatz verbliebene NAD(P)H-Konzentration. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

2. Ergebnisse

Tabelle IV. Peroxynitrit-abhängige Oxidation von NAD(P)H in An- und Abwesenheit von Dehydrogenasen

| Reaktionsansatz + Peroxynitrit (280 μM) | | NAD(P)H [μM] | Reaktionsansatz + Peroxynitrit (130 μM) | | NAD(P)H [μM] |
|---|----------------------|---------------------------|---|----------------------|---------------------------|
| NADH | (150 μM) | 50 ± 1 | NADH | (150 μM) | 95 ± 5 |
| + ADH | (10 μM) | 68 ± 5 | + AIDH | (10 μM) | 134 ± 1 |
| + G6-PDH | (10 μM) | 47 ± 4 | + GIDH | (10 μM) | 95 ± 4 |
| + GAPDH | (10 μM) | 76 ± 1 | + ICDH | (10 μM) | 90 ± 9 |
| | | | + MDH | (10 μM) | 116 ± 4 |
| NADPH | (150 μM) | 49 ± 3 | NADPH | (150 μM) | 90 ± 4 |
| + ADH | (10 μM) | 76 ± 7 | + AIDH | (10 μM) | 132 ± 2 |
| + G6-PDH | (10 μM) | 47 ± 5 | + GIDH | (10 μM) | 96 ± 3 |
| + GAPDH | (10 μM) | 63 ± 5 | + ICDH | (10 μM) | 89 ± 3 |
| | | | + MDH | (10 μM) | 111 ± 1 |

NAD(P)H (150 μM) wurde in An- und Abwesenheit von Dehydrogenasen (10 μM) mit Peroxynitrit (130 oder 280 μM) in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 20°C) inkubiert. Die NAD(P)H-Oxidation wurde 5 Minuten später durch spektrophotometrische Messungen der Extinktionsabnahme bei 340 nm bestimmt. Dargestellt ist die im Versuchsansatz verbliebene NAD(P)H-Konzentration. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

3. DISKUSSION

3.1. EINFLUSS DER UNTERSUCHTEN DEHYDROGENASEN AUF DIE NAD(P)H-OXIDATION

Vor mehr als 30 Jahren beschrieben Bielski und Chan eine radikalische Kettenreaktion, in der LDH-gebundenes NADH durch Superoxidanionen sowohl bei einem Kettenstart als auch in einer sich anschließenden Kettenreaktion oxidiert wird [86-90]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese LDH-katalysierte Kettenoxidation von NADH auch durch andere Oxidantien wie O_2 , H_2O_2 , HNO_2 und authentisches/*in situ* generiertes Peroxynitrit initiiert werden kann, die Kettenreaktion aber ausschließlich durch intermediär entstehendes $O_2^{\bullet-}$ vermittelt wird (Tabelle II, Einträge 5, 24, 31 und 34). Mechanistisch sind zwei Arten von Kettenstarts zu unterscheiden. Schwache oder mäßig starke Oxidantien (O_2 , H_2O_2 , HNO_2) initiieren die Kettenreaktion durch eine langsame Oxidation von LDH-gebundenem NADH zu NAD^{\bullet} (Tabelle II, Einträge 5, 24, 31), während starke Oxidantien (authentisches und *in situ*-generiertes Peroxynitrit) fast ausschließlich freies NADH oxidieren (Tabelle II, Eintrag 34).

Die Kettenreaktion wird vermutlich ausschließlich durch Superoxidanionen vermittelt, weil sowohl bei der Oxidation des freien als auch des LDH-gebundenen NADHs stets NAD^{\bullet} entsteht, welches nahezu diffusionskontrolliert molekularen Sauerstoff durch einen Ein-Elektronentransfer zum Superoxidanion reduziert (Gleichung 15). Zudem besitzt $O_2^{\bullet-}$ ein Redoxpotential, das zu niedrig ist, um freies NADH und Aminosäureseitenketten der LDH nennenswert zu oxidieren, jedoch ausreichend hoch ist, um mit LDH-gebundenem NADH effektiv zu reagieren.

Im Unterschied zum binären LDH-NADH-Komplex war keiner der anderen Dehydrogenase-NAD(P)H-Komplexe an einer radikalischen Kettenoxidation von NADH oder NADPH beteiligt, da die gebundenen Coenzyme ausschließlich mit dem zugesetzten Oxidans, nicht jedoch mit den sekundär entstehenden Superoxidradikalen reagierten. In Übereinstimmung hiermit hatten Chan & Bielski bereits experimentell belegt, dass die binären Komplexe MDH-NADH, GIDH-NADH und ICDH-NADPH nicht und der GAPDH-NADH-Komplex nur sehr langsam mit $O_2^{\bullet-}$ reagieren [91]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NADH und/oder NADPH in Anwesenheit der untersuchten Dehydrogenasen (mit Ausnahme von ICDH und GIDH) durch wenigstens ein Oxidans schneller oxidiert wurden. Hierbei wurde ausschließlich das physiologische

Coenzym verstärkt oxidiert (Ausnahme: Versuche mit G6-PDH), was wiederum beweist, dass die Bindung an die Coenzymbindungsstelle der Dehydrogenasen von entscheidender Bedeutung für die Coenzymoxidation ist. Warum in den Versuchen mit Glucose-6-phosphat Dehydrogenase NADH statt NADPH, dem eigentlichen Coenzym der Dehydrogenase, verstärkt oxidiert wurde, konnte nicht geklärt werden.

Ob und wie schnell NADH oder NADPH oxidiert wurden, hing entscheidend von zwei Faktoren ab, von der bindenden Dehydrogenase und dem Oxidans. Die Reaktionsgeschwindigkeit, mit der NADH autooxidiert, wurde durch die Bindung an die LDH signifikant erhöht. Von allen untersuchten binären Dehydrogenase-Coenzym Komplexen reagierte der AIDH-NADH-Komplex am schnellsten mit O_2 ($k = 2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Weitaus höhere Geschwindigkeitskonstanten wurden jedoch für die Reaktionen von HNO_2 mit ADH-NADH ($k = 370 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und LDH-NADH ($k = 520 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) gefunden (Tabelle II, Einträge 30 und 31). Unter den Reaktionen von Dehydrogenase-Coenzymkomplexen mit Oxidantien scheint allerdings die Reaktion von LDH-gebundenem NADH mit dem Superoxidanion unter physiologischen Bedingungen mit Abstand die schnellste Reaktion zu sein ($k = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [87]). Chan & Bielski berechneten zwar eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 2,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [91] für die Reaktion von GAPDH-NADH mit dem Perhydroxylradikal, jedoch spielt diese Reaktion in zellulären Systemen vermutlich nur eine untergeordnete Rolle, da dieses Radikal aufgrund des intrazellulären pH-Wertes kaum vorkommen sollte ($pK_a [\text{HO}_2^\bullet] = 4,7$ [128]).

Obwohl die Coenzymbindungsregionen der hier untersuchten Dehydrogenasen strukturell sehr ähnlich aufgebaut sind [94-96], verhielten sich die binären Komplexe der einzelnen Dehydrogenasen gegenüber den verschiedenen Oxidantien sehr unterschiedlich. Warum Dehydrogenasen die Oxidation ihres Coenzyms so unterschiedlich beeinflussen, konnte bisher nicht geklärt werden. Der Grund für den unterschiedlichen Einfluss der Enzyme sollte in den Eigenschaften der Aminosäureseitenketten liegen, die die α -Helices der Coenzymbindungsstelle bilden, da diese, im Gegensatz zu den eher konservativen β -Faltblättern, in ihrer Aminosäurezusammensetzung erheblich mehr variieren [96]. So vermuteten Chan & Bielski [91] z.B., dass in der Coenzymbindungsregion der GAPDH die Carboxylgruppe eines in der LDH nicht vorhandenen Aspartatrestes aufgrund ihrer negativen Ladung Superoxidanionen am Eintritt ins aktive Zentrum und damit an der Reaktion mit Enzym-gebundenem NADH hindert.

3.2. MÖGLICHE PRO- UND ANTIOXIDATIVE BEDEUTUNG DER BINÄREN DEHYDROGENASE-COENZYM-KOMPLEXE FÜR DIE ZELLE

Die dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindungen an Dehydrogenasen Änderungen der Redox-Eigenschaften des NADHs bzw. NADPHs bewirken. Da NADH und NADPH in Zellen fast ausschließlich an Dehydrogenasen gebunden vorliegen [80, 129], dürfte das im binären Dehydrogenase-Komplex gebundene NAD(P)H auch intrazellulär schneller mit Oxidantien reagieren als freies NAD(P)H. Die Coenzyme sollten somit erheblich zum antioxidativen System der Zelle beitragen, da alle Oxidantien, die mit NAD(P)H reagieren, über intermediäres NAD^\bullet zu Superoxid transformiert werden, welches effektiv durch die zelluläre Superoxid-Dismutase [65] abgebaut werden kann; das entstehende H_2O_2 wird letztendlich durch z.B. Glutathion-Peroxidase oder Katalase umgesetzt. Auch für die Dehydrogenasen wäre dies neben der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (NAD(P)H) und somit der Aufrechterhaltung des zellulären Redox-Status, wie es für ICDH, GIDH, G6-PDH und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase beschrieben worden ist [65, 79, 82, 119, 130-132], ein weiterer, bisher wenig beachteter antioxidativer Wirkungsmechanismus. Als eine Ausnahme hiervon ist allerdings LDH-gebundenes NADH anzusehen, da schwache und mäßig starke Oxidantien wie O_2 , H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ und HNO_2 in der Lage sind durch eine langsame, direkte Reaktion mit dem Enzym-gebundenen Coenzym eine Kettenoxidation des LDH-gebundenen NADHs zu initiieren (Tabelle II, Einträge 5, 15, 24, 31), aus der pro Kettenreaktionszyklus ein Molekül H_2O_2 und ein Superoxidanion resultieren (Gleichung 15-17). So wird die durch O_2 , H_2O_2 und HNO_2 initial langsame Oxidation von LDH-gebundenem NADH durch intermediär entstehendes Superoxid drastisch beschleunigt. Aufgrund der kontinuierlichen Entstehung von Superoxid und der zusätzlichen Neubildung von H_2O_2 ist der binäre LDH-NADH-Komplex somit sogar als Prooxidans einzustufen.

In zellulären Systemen sollte die durch die LDH-vermittelte Kettenoxidation von NADH – und somit auch die Bildung zusätzlicher reaktiver Sauerstoffspezies – normalerweise effektiv durch die Aktivität der Superoxid-Dismutase, Katalase und der Glutathion-Peroxidase verhindert werden, da diese Enzyme intrazellulär in hohen Konzentrationen vorliegen. $\text{O}_2^{\bullet-}$ spielt allerdings in Systemen, in denen das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien gestört ist, d.h. in oxidativen Stresssituationen eine entscheidende Rolle, so z.B. im postischämischen Herzen und Skelettmuskelgewebe [133]. Auch extreme physische Belastungen können zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Muskelgeweben führen [6]. Bei starker körperlicher Anstrengung sinkt

der Sauerstoffpartialdruck im Muskel erheblich ab. Folglich wird in der Glykolyse mehr NADH gebildet als üblicherweise durch die Atmungskette verbraucht wird, da dieser nun der Elektronenendakzeptor fehlt. Unter anaeroben Bedingungen wird NADH zwar zunächst durch die homolactische Fermentation zu NAD^+ reoxidiert [134], allerdings kommt auch das Pyruvat/Lactat-System bei länger andauernder Hypoxie bzw. starker Anreicherung von Lactat zum Erliegen, so dass die Elektronentransportsysteme reduziert vorliegen [135]. Wird der Muskel nun reoxygeniert (z.B. in der Erholungsphase), kann es durch die Reduktion des Sauerstoffes zu einer vermehrten $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 -Bildung kommen [6]. Zusätzlich fanden Radák *et al.* [136] einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Lactatkonzentration und der $\text{O}_2^{\bullet-}$ -bildenden Xanthin-Oxidaseaktivität im Blut. Bedingt durch die pH-Absenkung im Muskel erhöht sich zudem der Anteil der aus $\text{O}_2^{\bullet-}$ hervorgehenden Perhydroxylradikale [24]. Da für die Glykolyse bekannt ist, dass die Enzymbindungsstellen die Substratkonzentrationen übersteigen [137], wäre es möglich, dass GAPDH-NADH mit HO_2^{\bullet} und der LDH-NADH-Komplex mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ reagiert, wodurch es zu einer verstärkten Bildung von ROS (s.o.) in der Kettenreaktion käme. Dies könnte zu verstärkten Gewebeschäden (Muskelkater) durch freigesetzte ROS führen. Ob allerdings binäre Dehydrogenase-NADH-Komplexe unter derartigen Situationen eine Rolle spielen, ist derzeit noch unklar. Erstaunlich ist allerdings, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundenen Eigenschaften der Dehydrogenase-NAD(P)H-Komplexe bislang noch nicht beschrieben wurden. Dies könnte daran liegen, dass unter den üblichen experimentellen Bedingungen oft unphysiologisch niedrige Enzymkonzentrationen eingesetzt werden, obwohl schon Aragón [138] und Srere [139] bemerkten, dass zahlreiche Enzyme sehr individuelle Charakteristiken aufweisen, wenn sie im Bereich ihrer physiologischen Konzentrationen (meist im mikromolaren Bereich) untersucht werden.

3.3. ANMERKUNGEN ZU DEN KINETISCHEN SIMULATIONEN

I. Einige Geschwindigkeitskonstanten der hier untersuchten Kettenstarts basieren nicht auf experimentellen Daten, sondern wurden ausschließlich durch kinetische Simulationen ermittelt. Der Grund hierfür ist die z.T. sehr geringe Geschwindigkeit dieser Reaktionen, die den experimentellen Fehler überproportional erhöht. Die Nutzung großer kinetischer Modelle (> 100 Reaktionen) hat den Vorteil, dass keine unerwartet wichtigen Reaktionen durch subjektive Einschätzungen ausgeschlossen werden. Ein Nachteil mag sein, dass einige

Reaktionen des Modells überflüssig und/oder redundant sein können und die Wichtigkeit einer einzelnen Reaktion unklar bleibt. Um die Bedeutung einer Reaktion in einem solchen kinetischen Modell bestimmen zu können, sind eine Sensitivitätsanalyse und diverse andere rechnerische Methoden erforderlich, die in einer aktuell publizierten Arbeit [140] zusammengefasst worden sind. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Reaktionen wurden durch eine auf NSCs basierend PCA ermittelt und gewichtet. Durch die Eliminierung unwichtiger Reaktionen war es möglich, die O_2 - bzw. H_2O_2 -abhängige Oxidation von LDH-gebundenem NADH durch 23 beziehungsweise 18 Reaktionen zu beschreiben.

II. Im Gegensatz zu den Experimenten mit schwachen Oxidantien, konnte der NADH-Verbrauch durch starke Oxidantien nur in Abwesenheit von Dehydrogenasen befriedigend simuliert werden. Dies scheint an den gegenwärtig noch unbekannten Reaktionen zu liegen, die das Oxidans mit dem Enzym eingeht. Ein Hinweis auf solche Reaktionen war die verminderte NAD(P)H-Oxidation in Anwesenheit einiger Dehydrogenasen. Beteiligt sollten die auf der Proteinoberfläche und in der katalytischen Region lokalisierten Phenyl-, Tyrosyl- und Tryptophanyl- sowie Cysteinyreste sein, da sie bekannte Ziele oxidativer Angriffe sind [20, 47, 48, 50, 141]. Aus eigenen, bislang unveröffentlichten Ergebnissen geht hervor, dass nach Zugabe von Oxidantien zwar die entsprechende Aminosäurefluoreszenz der LDH abnimmt, das Enzym aber immer noch uneingeschränkt katalytisch aktiv ist. Daher scheinen diese oxidierbaren Aminosäuregruppen nicht zwangsläufig an der Katalyse beteiligt zu sein. Die oft leicht oxidierbaren Aminosäuregruppen im aktiven Zentrum können durch gebundene Coenzyme sterisch vor oxidativen Angriffen geschützt werden [82-85, 142, 143]. Die Fängereigenschaften der LDH beantworten nur teilweise die Frage, warum starke Oxidantien, wie z.B. Peroxynitrit, nicht direkt das Enzym-gebundene NAD(P)H oxidieren, obgleich dieses reaktiver als das freie Coenzym ist. Eine weitere Erklärung hierfür ist, dass Enzym-gebundenes NAD(P)H durch die Coenzymbindungskavität vor Oxidantien im umgebenden Medium abgeschirmt wird, was auf Röntgenstrukturanalysen basierenden molekularen Modellen von Coenzymbindungsstellen erkennbar ist [94-96]. Aus diesen Gründen ist es wahrscheinlicher, dass starke Oxidantien eher mit den Aminosäureresten der Dehydrogenasen als mit dem Enzym-gebundenen Coenzym reagieren. Einige Autoren behaupten auch, dass Peroxynitrit in bicarbonatfreien Systemen nur schlecht direkt mit NADH reagiert [123], während andere dem Peroxynitrit neben seiner hohen Reaktivität auch eine hohe Selektivität bei der Oxidation von biologischen Molekülen bescheinigen [144], was unsere Daten am ehesten bestätigt.

4. ZUSAMMENFASSUNG

In Zellen liegen NADH und NADPH vorwiegend in binären Komplexen an Dehydrogenasen gebunden vor. Chan und Bielski haben durch Arbeiten mit zellfreien Systemen gezeigt, dass der binäre Lactat-Dehydrogenase-NADH-Komplex anders als das ungebundene Coenzym schnell mit Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$) reagiert. Hierbei induziert und propagiert das Superoxidanion eine radikalische Kettenreaktion, in der das an die LDH gebundene NADH oxidiert wird. Im Rahmen der Kettenreaktion wird das Superoxid regeneriert und ein Wasserstoffperoxidmolekül pro Zyklus freigesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktivität des LDH-gebundenen und des freien NADHs auch gegenüber anderen Oxidantien als $O_2^{\bullet-}$ (O_2 , H_2O_2 , HNO_2 und authentisches/*in situ* generiertes Peroxynitrit) vergleichend untersucht. Zudem sollte die Frage geklärt werden, ob diese Oxidantien ebenfalls in der Lage sind, eine radikalische Kettenreaktion zu initiieren und ggf. zu propagieren. Da die Coenzymbindungsstellen der NAD(P)(H)-abhängigen Dehydrogenasen strukturell sehr ähnlich konstruiert sind und damit auch der Einfluss der Dehydrogenasen auf das Coenzym ähnlich sein sollte, wurden neben der LDH noch weitere Dehydrogenasen untersucht: Alkohol-Dehydrogenase (ADH), Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6-PDH), Glutamat-Dehydrogenase (GIDH), Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) und Malat-Dehydrogenase (MDH).

Die LDH steigerte die durch O_2 , H_2O_2 , HNO_2 und Peroxynitrit vermittelte Oxidation von NADH, nicht jedoch die von NADPH. Die Steigerung der NADH-Oxidation durch die LDH konnte in allen Fällen durch Superoxid-Dismutase (SOD) unterbunden werden, was auf eine Beteiligung von Superoxid schließen ließ. Unter zur Hilfenahme kinetischer Simulationen konnte zwischen dem Modus der NADH-Oxidation durch einerseits starke (= hochreaktive) und andererseits schwache (= weniger reaktive) Oxidantien unterschieden werden. Starke Oxidantien wie Peroxynitrit reagierten vorwiegend mit dem anfänglich in höherer Konzentration vorliegenden, ungebundenen NADH, wohingegen schwache Oxidantien wie O_2 , H_2O_2 und HNO_2 nahezu ausschließlich mit dem LDH-gebundenen NADH reagierten. In beiden Fällen reduzierte das entstehende NAD^{\bullet} -Radikal molekularen Sauerstoff zu $O_2^{\bullet-}$, das wiederum die radikalische Kettenreaktion propagierte.

Mit wenigen Ausnahmen steigerten auch alle anderen untersuchten Dehydrogenasen die Oxidation ihres physiologischen Coenzym durch wenigstens ein Oxidans. Ob und wie schnell NADH bzw. NADPH oxidiert wurde, hing von der Coenzym-bindenden

Dehydrogenase und von der Art und Konzentration des applizierten Oxidans ab. Im Unterschied zu den Versuchen mit der LDH wurde die gesteigerte NAD(P)H-Oxidation in Gegenwart von ADH, AIDH, G6-PDH, GAPDH und MDH durch SOD weder eingeschränkt noch verhindert. Dies deutet darauf hin, dass die binären Dehydrogenase-Coenzym-Komplexe zwar bimolekular mit den Oxidantien (O_2 , H_2O_2 , HNO_2) reagierten, es aber zu keiner Reaktion mit Superoxid und folglich auch zu keiner Superoxid-vermittelten radikalischen Kettenoxidation (Kettenreaktion) des Coenzym kam.

Eine vergleichbar schnelle Reaktion, wie die von Chan und Bielski gefundene Reaktion des binären LDH-NADH-Komplexes mit Superoxid ($k = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), konnte bei keiner anderen Dehydrogenase beobachtet werden.

Die Bedeutung dieser *in vitro* gefundenen Mechanismen für das Redox-Gleichgewicht der Zelle ist derzeit noch unklar. Weiterführende intrazelluläre Untersuchungen sind hierfür erforderlich. Dennoch deutet einiges darauf hin, dass diese durch binäre Dehydrogenase-Coenzym-Komplexe vermittelte Steigerung der Reaktivität gegenüber Oxidantien sowie die von LDH-NADH und GAPDH-NADH gezeigten radikalischen Kettenreaktionen durchaus eine wichtige Rolle in Hypoxie-/Reoxygenierungsschädigungssystemen spielen können.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. MATERIAL

5.1.1. Chemikalien

Roche Molecular Biochemicals
(Mannheim, Deutschland):

| | |
|---|-------------|
| Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus Hefe | EC 1.1.1.1 |
| Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) aus Hefe | EC 1.2.1.5 |
| Glucose-6-phosphat- Dehydrogenase (G6-PDH) aus Hefe | EC 1.1.1.49 |
| Glutamat-Dehydrogenase (GIDH) aus Rinderleber | EC 1.4.1.3 |
| Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GIDH) aus Kaninchenmuskel | EC 1.2.1.12 |
| Katalase aus Rinderleber | EC 1.11.1.6 |
| L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus Rindermuskel | EC 1.1.1.28 |
| Malat-Dehydrogenase (MDH) aus Schweineherz | EC 1.1.1.37 |
| Superoxid-Dismutase (SOD) aus Rindererythrozyten | EC 1.15.1.1 |
| NADH | |
| NADPH | |

Sigma
(Seelze, Deutschland):

Chelex 100

Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)

Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) EC 1.1.1.42
aus Schweineherz

Mangandioxid

Oxamat

Wasserstoffperoxid

Merck
(Darmstadt, Deutschland):

Kalium-Dihydrogenphosphat

Di-Kalium-Hydrogenphosphat

Natriumnitrit

Natronlauge

n-Hexan

Aventis
(Frankfurt/Main, Deutschland):

3-Morpholinosydnonimin (SIN-1)

Boehringer
(Mannheim, Deutschland):

Pyruvat

Selbst synthetisiert
(s. 5.2.1.):

Peroxynitrit (ONOO⁻/ONOOH)

5.1.2. Materialien & Geräte

Eppendorf
(Hamburg, Deutschland):

Kunststoffreaktionsgefäße

Schott
(Mainz, Deutschland):

Scheidetrichter

Glassäulen (Gelfiltration)

Bechergläser (div. Größen)

Messzylinder

Hellma
(Müllheim, Deutschland):

Quarzküvetten (Halbmikroküvetten)

Fluoreszenzküvetten (Vollküvetten)

Eigenbau der technischen
Abteilung des UK Essen:

Glovebox

GMS
(Kiel-Mielkendorf,
Deutschland):

Sauerstoffmessgerät
LICOX MCB[®] Oxygen Monitor

PerkinElmer Life Science
(Norwalk, CT, USA):

Spektralphotometer
UV/Visible Lambda 40

Shimadzu
(Duisburg, Deutschland):

Spektralphotometer
UV mini 1240

Spektralfluorometer
RF-1501

Beckman Coulter
(Krefeld, Deutschland):

Ultrazentrifuge
OptimaTM L-70k

Zentrifugenrotor 70 Ti

VWR International GmbH
(Darmstadt, Deutschland):

Vitalab Selectra E

5.2. METHODEN

5.2.1. Herstellung von Peroxynitrit

Die Synthese von Peroxynitrit erfolgte entsprechend der Arbeit von Uppu und Pryor [145]. Zuerst wurden zwei Lösungen angesetzt. Für Lösung 1 wurden 5 ml 0,5 N NaOH (+ 40 mM DTPA), 25 ml 5 N NaOH, 11 ml H₂O₂ gemischt und mit Aqua bidest., das 0,1 mM DTPA enthielt, auf 100 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Für Lösung 2 wurden 15 ml Isoamylnitrit viermal mit jeweils 30 ml Aqua bidest., das 0,1 mM DTPA enthielt, im Scheidetrichter gewaschen. Anschließend wurden 100 ml Lösung 1 und 13,3 ml Lösung 2 gemischt und bei 4°C über Nacht kräftig gerührt. Das Produkt wurde dann sechsmal mit jeweils 100 ml N-Hexan im Scheidetrichter gewaschen. Nun wurde eine Glassäule (Länge ca. 30 cm, Durchmesser ca. 1,5 cm), die normalerweise zur Gelfiltration verwendet wird, mit 25 g MnO₂ befüllt. Das MnO₂ wurde zunächst mit 50 ml Aqua bidest. und dann mit 50 ml 0,5 N NaOH gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit Eis ummantelt. Nun wurde das gewaschene Produkt portionsweise auf die gekühlte Säule gegeben. Die ersten 10 ml wurden verworfen. Der Rest wurde dann in einem gekühlten Becherglas aufgefangen. Um das überschüssige Hexan zu entfernen, wurde die Lösung für 15 Minuten mit reinem Stickstoff begast. Nach der Portionierung in 1,5 ml Kunststoffreaktionsgefäßen wurde das fertige Peroxynitrit bei -80°C

eingefroren. Die Konzentration des synthetisierten Peroxynitrits wurde bestimmt, indem eine Probe zunächst 1:1000 mit 0,5 N NaOH verdünnt und anschließend die Absorption photometrisch bei 302 nm gemessen wurde (Shimadzu, Duisburg, Deutschland; Typ UV mini 1240). Der Extinktionswert wurde durch 1,67 dividiert und ergab die Peroxynitritkonzentration in Mol pro Liter.

5.2.2. Bestimmung der Bindungsstöchiometrie zwischen LDH und NADH sowie NADPH

Die Bestimmung der Bindungsstöchiometrie von NADH oder NADPH und LDH erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Velick *et al.* [107] mittels Ultrazentrifugation in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (pH 7,5) bei 20°C. NADH oder NADPH (4,2 μM) wurde mit oder ohne LDH (0,1-4,2 μM) in Phosphat-Puffer inkubiert. Dann wurde je Probe die Enzymaktivität der LDH nach den Angaben von Bergmeyer *et al.* mit Hilfe eines Laborautomaten (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland; Typ Vitalab Selectra E) bestimmt [146] und parallel Fluoreszenzspektren von NADH bzw. NADPH ($\lambda_{\text{exc.}} = 340$ nm; $\lambda_{\text{em.}} = 400\text{-}600$ nm) mit einem Spektralfluorometer (Shimadzu, Duisburg, Germany; Typ RF-1501) aufgenommen. Nach der Ultrazentrifugation der Proben ($371000 \times g$ bei 20°C für 5 h; Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland; Typ OptimaTM L-70K, Rotortyp 70 Ti), wurden erneut im Überstand und nach Resuspension des Pellets die Enzymaktivität bestimmt und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die Konzentration des durch die LDH gebundenen NADHs bzw. NADPHs wurde anhand der Differenz der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität im Überstand vor und nach der Zentrifugation sowie nach der Korrektur um die Coenzymkonzentration, die in Abwesenheit der LDH abzentrifugiert wurde, kalkuliert. Die Bindungsstöchiometrie (BS) wurde dann aus dem Quotient des LDH-gebundenen NADHs bzw. NADPHs und der Enzymkonzentration berechnet (Gleichung 19).

$$\text{BS} = \frac{[\text{LDH-NADH}]}{[\text{LDH}]} \quad (19)$$

5.2.3. Bestimmung der Bindungsstöchiometrie zwischen weiteren Dehydrogenasen und NADH bzw. NADPH

Die für die LDH beschriebene Methode zur Bestimmung der Enzym-Coenzym-Bindungsstöchiometrie konnte aufgrund technischer Probleme nicht auf die anderen Dehydrogenasen übertragen werden. Da sich jedoch die experimentell für die Bindung von LDH und NADH ermittelten Werte mit denen deckten, die basierend auf reaktionskinetischen Daten der Literatur [146] errechenbar waren, wurden die Bindungsstöchiometrien der anderen Dehydrogenasen und ihrer Coenzyme anhand von Literaturdaten berechnet. Die Bildung binärer Dehydrogenase-Coenzymkomplexe verläuft sehr schnell ($k_1 \approx 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [102]). Daher lässt sich die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion (k_{-1}) näherungsweise aus den in der Literatur [146] publizierten Michaeliskonstanten (K_m) berechnen.

$$k_{-1} = k_1 \times K_m \quad (20)$$

ADH [95, 147, 148], AIDH [149], GAPDH [95, 150] und G6-PDH [151] sind Tetramere, während MDH [95] und ICDH [152] Dimere sind. Allein GIDH besteht aus sechs Untereinheiten (Hexamer), die jeweils 2 Coenzymbindungsstellen besitzen [153]. Alle Enzyme können, abhängig von ihren Bindungskonstanten und der Coenzymkonzentration, maximal ein Coenzymmolekül pro Untereinheit binden.

5.2.4. Messung des Effekts von O_2 , H_2O_2 und HNO_2 auf die NADH- oder NADPH-Oxidation in Gegenwart von Dehydrogenasen

Der Effekt der Dehydrogenasen ADH, AIDH, GAPDH, GIDH, G6-PDH, ICDH und MDH ($10 \text{ } \mu\text{M}$) auf die Autoxidation von NADH bzw. NADPH ($150 \text{ } \mu\text{M}$) durch molekularen Sauerstoff wurde in Phosphat-Puffer (50 mM , $\text{pH } 7,0$, 37°C), versetzt mit DTPA ($100 \text{ } \mu\text{M}$), untersucht. Die Versuche wurden unter Umgebungsatmosphäre ($p\text{O}_2 = 202\text{-}205 \text{ hPa}$) und vergleichend in Gegenwart von SOD (50 U ml^{-1}) oder unter Hypoxie (Argonatmosphäre, $p\text{O}_2 = \leq 4,7 \text{ hPa}$) in einer speziell hierfür konstruierten Glovebox durchgeführt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde mit dem Sauerstoffmessgerät, LICOX MCB[®] Oxygen Monitor (GMS, Kiel-Mielkendorf, Deutschland) bestimmt. Zusätzlich wurden einige Experimente mit AIDH in Anwesenheit von Katalase (130 U l^{-1}) wiederholt. Der oxidative Einfluss von H_2O_2

(600 μM) auf NADH und NADPH in An- und Abwesenheit der Dehydrogenasen wurde unter den gleichen Bedingungen gemessen.

HNO_2 wurde, wie in Gleichung 21 dargestellt, aus Nitrit (NO_2^-) generiert. Dem Phosphat-Puffer (50 mM, 37°C) mit DTPA (100 μM) wurde hierfür NaNO_2 (10 mM) zugegeben. Der pH-Wert von 7,0 (statt 7,5) ist ausgewählt worden, um die Bildung von HNO_2 zu stimulieren; aufgrund des niedrigen pKa-Wertes ($\text{pKa}(\text{HNO}_2) = 3,1$; [154]) nimmt die Bildung von HNO_2 aus NaNO_2 mit abnehmendem pH-Wert stark zu. Auch in den Experimenten mit H_2O_2 und HNO_2 wurde NADH oder NADPH in An- und Abwesenheit der Dehydrogenasen (10 μM) und SOD (50 U ml^{-1}) inkubiert sowie der Einfluss von Sauerstoff (s.o.) untersucht.



Aus einer kinetischen Simulation, gerechnet mit einem in einer früheren Arbeit veröffentlichten Datensatz [42], ging hervor, dass über eine Reaktionszeit von 120 Minuten aus 10 mM NaNO_2 nur HNO_2 in nennenswerten Konzentrationen entsteht (Gleichgewichtskonzentrationen bei pH 7,0: $\text{HNO}_2 = 1,25 \mu\text{M}$, $\bullet\text{NO}_2 = 0,1\text{-}0,8 \text{ nM}$, $\text{N}_2\text{O}_3 = 0,15 \text{ pM}$, $\text{N}_2\text{O}_4 = 0,02\text{-}0,15 \text{ pM}$).

5.2.5. Bestimmung des Effektes von Peroxynitrit auf die Oxidation von NADH oder NADPH in An- und Abwesenheit von Dehydrogenasen

Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 25°C) mit oder ohne einer Dehydrogenase (ADH, ALDH, GAPDH, G6-PDH, GLDH, ICDH oder MDH: jeweils 10 μM ; LDH: 5-20 μM) in Kunststoffreaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde NADH oder NADPH (150 μM) zugesetzt. Dann wurde Peroxynitrit (100-280 μM) auf die trockene Innenseite des Deckels des Reaktionsgefäßes pipettiert, anschließend das Gefäß geschlossen und dieses schnell geschüttelt, um zu garantieren, dass das Peroxynitrit vor seinem Zerfall in der Lösung homogen verteilt wurde. Diese auch als „Drop-tube Vortex-Mixer-Methode“ bekannte Vorgehensweise wurde 1998 erstmals von Kirsch *et al.* [155] beschrieben. Die NADH- oder NADPH-Oxidation wurde danach photometrisch aufgrund der Absorptionsabnahme bei 340 nm bestimmt (Shimadzu, Duisburg, Deutschland; Typ UV mini 1240). In einigen Experimenten wurde vor der Zugabe von Peroxynitrit SOD (20-50 U ml^{-1}) zugesetzt, um den

Einfluss von Superoxidanionen zu untersuchen. In Ansätzen mit LDH wurde dem Versuchsansatz vor der Zugabe von Peroxynitrit Oxamat (1 mM), ein nicht metabolisierbares Substratanalogon [156], welches das katalytische Zentrum des Enzyms irreversibel verschließt, zugesetzt.

Zudem wurden Experimente mit 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1), das *in situ* Peroxynitrit generiert, durchgeführt. Die hierfür geltenden Versuchsbedingungen waren mit denen für das authentische Peroxynitrit identisch. SIN-1 (1 mM) wurde dem Versuchsansatz, bestehend aus Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 25°C), NADH oder NADPH (150 µM) und DTPA (100 µM) in An- und Abwesenheit von Dehydrogenasen (10 µM) zugesetzt und die NADH- bzw. NADPH-Oxidation kontinuierlich (Messintervall: 0,1 Minute) für 30-80 Minuten anhand der Absorptionsabnahme bei 340 nm verfolgt (PerkinElmer Life Sciences, Norwalk, CT, USA; Typ UV/Visible Lambda 40). Weitere Experimente wurden in Anwesenheit von SOD (20-50 U ml⁻¹) durchgeführt. In Experimenten mit LDH wurde wiederum Oxamat (1 mM) eingesetzt.

5.2.6. Kinetische Simulationen der NADH- oder NADPH-oxidierenden Reaktionen

Die kinetischen Simulationen wurden in Kooperation mit Herrn Priv.-Doz. Dr. Michael Kirsch unter Anwendung des KINTECUS V3.8 Programms [117] von Herrn Dr. James C. Ianni (www.kintecus.com) durchgeführt. Das grundlegende kinetische Modell, das insgesamt diejenigen 118 Reaktionen zwischen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies berücksichtigt, die unter physiologischen Bedingungen bekannt sind [42], wurde vergrößert um die Oxidation des NAD(P)Hs berechnen zu können. Dieser erweiterte Reaktionssatz berücksichtigt sowohl die bekannten Reaktionen zwischen den reaktiven Spezies und NAD(P)H als auch die Ad- und Desorption des Coenzym an das Enzym (Tabelle I und II). Da der Reaktionssatz alle bekannten Reaktionen berücksichtigt, die unter physiologischen Bedingungen ablaufen können, müssen Abweichungen der simulierten Werte zu experimentellen Daten mit dem Auftreten von unbekannten Reaktionen erklärt werden. Wenn nicht anders erwähnt, konnten die unbekannten Reaktionen durch angenommene Reaktionen ersetzt werden. Durch die Simulation der Coenzymoxidation und gleichzeitigen Integration der Konzentrationen der beteiligten Spezies über den simulierten Versuchszeitraum ist es dem Programm möglich, für eine angenommene Reaktion eine zuvor unbekannte Geschwindigkeitskonstante ($k_{virt.}$) zu berechnen. Anschließend wurden für einige Simulationen Sensitivitätsanalysen [140] durchgeführt, um festzustellen, welche Reaktionen

in dem jeweiligen Versuchsansatz tatsächlich von Bedeutung sind, und die Einzelreaktionen nach ihrer Priorität sortiert. Hierfür wurden zuerst die „Normalized Sensitivity Constants“ (NSCs) mithilfe des KINTECUS-Programms wie folgt berechnet:

$$\text{NSC} = \frac{\delta \ln [\text{Spezies}]}{\delta \ln k} \quad (22)$$

Mithilfe des ATROPOS-Programms (ebenfalls von Herrn Dr. James C. Ianni) wurden nun analog zu [157] die NSCs durch eine "Principle Component Analysis" (PCA) für 80 Zeitpunkte analysiert. Das ATROPOS-Programm eliminiert mit der PCA alle überflüssigen und redundanten Reaktionen und ordnet die übrigen Reaktionen nach ihrer Wichtigkeit, nachdem für diese Reaktion der korrespondierende "Overall Sensitivity Coefficient" (B_r) berechnet worden ist.

5.2.7. Statistik

Alle Experimente wurden mindestens zweimal in Form von Doppelansätzen durchgeführt. Die in den Abbildungen gezeigten Verläufe sind repräsentativ für alle entsprechend durchgeführten Experimente. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt.

6. LITERATUR

- 1 Nordberg, J. and Arnér, E. S. J. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1287-1312
- 2 Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527-601
- 3 Khan, A. U. and Kasha, M. (1994) Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12365-12367
- 4 Slater, A. F. G., Nobel, S. I. and Orrenius, S. (1995) The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochim. Biophys. Act.* **1271**, 59-62
- 5 Arnaiz, S. L., Coronel, M. F. and Boveris, A. (1999) Nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide production in brain mitochondria after haloperidol treatment. *Nitric Oxide* **3**, 235-243
- 6 Navarro-Arévalo, A., Cañavate, C. and Sánchez-del-Pino, M. J. (1999) Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. *Mech. Ageing Dev.* **108**, 207-217
- 7 Freeman, B. A. and Crapo, J. D. (1981) Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J. Biol. Chem.* **256**, 10986-10992
- 8 Bailey, S. and Cunningham, C. C. (1998) Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes. *Hepatology* **28**, 1318-1326
- 9 Weiss, S. J. and LoBuglio, A. F. (1982) Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab. Invest.* **47**, 5-18
- 10 Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244-4250
- 11 Jones, R. D., Hancock, J. T. and Morice, A. H. (2000) NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 416-424
- 12 Betteridge, D. J. (2000) What is oxidative stress? *Metabolism* **49**, 3-8
- 13 Halliwell, B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* **1**, 358-364
- 14 Zigman, S. (2000) Lens UVA photobiology. *J. Ocul. Pharmacol. Th.* **16**, 161-165

- 15 Schmidt, H. H. H. W., Hofmann, H., Schindler, U., Shutenko, Z. S., Cunningham, D. D. and Feelisch, M. (1996) No[•]NO from NO synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14492-14497
- 16 Horie, Y., Wolf, R. and Granger, D. N. (1997) Role of nitric oxide in gut ischemia-reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction. *Am. J. Physiol.* **273**, G1007-1013
- 17 Loguercio, C. and Federico, A. (2003) Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1-10
- 18 Ross, A. B., Mallard, W. G., Helman, W. P., Buxton, G. V., Huie, R. E. and Neta, P. (1998) NDRL/NIST Solution Kinetics Database 3.0. In NDRL/NIST, Gaithersburg, MD
- 19 Beckman, J. S. and Koppenol, W. H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite. *Am. J. Physiol.* **271**, C1424-C1437
- 20 Shenton, D. and Grant, C. M. (2003) Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **374**, 513-519
- 21 Tavazzi, B., Di Pierro, D., Amorini, A. M., Fazzina, G., Galvano, M., Lupi, A., Giardina, B. and Lazzarino, G. (2000) Direct NAD(P)H hydrolysis into ADP-ribose(P) and nicotinamide induced by reactive oxygen species: a new mechanism of oxygen radical toxicity. *Free Radic. Res.* **33**, 1-12
- 22 Halliwell, B. (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* **31**, 261-272
- 23 Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85
- 24 Reiter, R. (1998) Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.* **56**, 359-384
- 25 Bielski, B. H. J. and Allen, A. O. (1977) Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals. *J. Phys. Chem.* **81**, 1048-1050
- 26 Crow, J. P., Beckman, J. S. and McCord, J. M. (1995) Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxynitrite. *Biochemistry* **34**, 3544-3552

- 27 DeMaster, E. G., Shirota, F. N. and Nagasawa, H. T. (1985) Catalase mediated conversion of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase. *Alcohol* **2**, 117-121
- 28 Dulic, V. and Gafni, A. (1987) Mechanism of aging of rat muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase studied by selective enzyme oxidation. *Mech. Ageing Dev.* **40**, 289-306
- 29 Halliwell, B. (1999) Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat. Res.* **443**, 37-52
- 30 Beckman, J. S., Ye, Y. Z., Anderson, P., Chen, J., Accavetti, M. A., Tarpey, M. M. and White, C. R. (1994) Extensive nitration of protein tyrosines observed in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375**, 81-88
- 31 Bodaness, R. S. and Chan, P. C. (1977) Singlet oxygen as a mediator in the hematoporphyrin-catalyzed photooxidation of NADPH to NADP⁺ in deuterium oxide. *J. Biol. Chem.* **252**, 8554-8560
- 32 Petrat, F., Pindiur, S., Kirsch, M. and de Groot, H. (2003) NAD(P)H, a primary target of ¹O₂ in mitochondria of intact cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 3298-3307
- 33 Petrat, F., Pindiur, S., Kirsch, M. and de Groot, H. (2003) "Mitochondrial" photochemical drugs do not release toxic amounts of ¹O₂ within the mitochondrial matrix space. *Arch. Biochem. Biophys.* **412**, 207-215
- 34 Sevanian, A. and McLeod, L. L. (1987) Cholesterol autoxidation in phospholipid membrane bilayers. *Lipids* **22**, 627-636
- 35 Jacobson, E. L., Giacomoni, P. U., Roberts, M. J., Wondrak, G. T. and Jacobson, M. K. (2001) Optimizing the energy status of skin cells during solar radiation. *J. Photochem. Photobiol. B.* **63**, 141-147
- 36 Clark, A. G. and Debnam, P. (1998) Inhibition of glutathione-S-transferases from rat liver by S-nitroso-L-glutathione. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 3199-3201
- 37 DeMaster, E. G., Redfern, B. and Nagasawa, H. T. (1998) Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by nitroxyl, the active metabolite of the alcohol deterrent agent cyanamide. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 2007-2015
- 38 Ewing, J. F., Janero, D. R., Grinnell, T. A., Schroeder, J. D. and Garvey, D. S. (1997) Reactivity of nitrogen monoxide species with NADH: implications for nitric oxide-

- dependent posttranslational protein modification. Arch. Biochem. Biophys. **343**, 131-139
- 39 Mannick, J. B., Schonhoff, C., Papeta, N., Ghafourifar, P., Szibor, M., Fang, K. and Gaston, B. (2001) S-nitrosylation of mitochondrial caspases. J. Cell Biol. **154**, 1111-1116
- 40 Hashida, K., Sasaki, K. and Makino, N. (2000) Interactions of nitric oxide and oxygen in cytotoxicity: proliferation and antioxidant enzyme activities of endothelial cells in culture. Free Radic. Res. **33**, 147-156
- 41 Zhang, R., Goldstein, S. and Samuni, A. (1999) Kinetics of superoxide-induced exchange among nitroxide antioxidants and their oxidized and reduced forms. Free Radic. Biol. Med. **26**, 1245-1252
- 42 Kirsch, M., Korth, H.-G., Wensing, A., Sustmann, R. and de Groot, H. (2003) Product formation and kinetic simulations in the pH range 1-14 account for a free-radical mechanism of peroxynitrite decomposition. Arch. Biochem. Biophys. **418**, 133-150
- 43 Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M. and Cayota, A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. Free Radic. Biol. Med. **30**, 463-488
- 44 Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H. and Crow, C. P. (1994) Oxidative chemistry of peroxynitrite. Methods. Enzymol. **233**, 229-240
- 45 Balabanli, B., Kamisaki, Y., Martin, E. and Murad, F. (1999) Requirements for heme and thiols for the nonenzymatic modification of nitrotyrosine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 13136-13141
- 46 Berlett, B. S., Levine, L. and Stadtman, E. R. (1997) Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 2784-2789
- 47 Souza, J. M. and Radi, R. (1998) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. Arch. Biochem. Biophys. **360**, 187-194
- 48 Lee, J. H., Yang, E. S. and Park, J.-W. (2003) Inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by peroxynitrite: implications for cytotoxicity and alcohol induced liver injury. J. Biol. Chem. **278**, 51360-51371
- 49 MacMillan-Crow, L. A., Crow, J. P., Kerby, J. D., Beckman, J. S. and Thompson, J. A. (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 11853-11858

- 50 Francescutti, D., Baldwin, J., Lee, L. and Mutus, B. (1996) Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site. *Protein Eng.* **9**, 189-194
- 51 Padmaja, S., Squadrito, G. L. and Pryor, W. A. (1998) Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **349**, 1-6
- 52 Salvemini, D. (1997) Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 576-582
- 53 Szabados, E., Fischer, G. M., Toth, K., Csete, B., Nemeti, B., Trombitas, K., Habon, T., Endrei, D. and Sumega, B. (1999) Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of the AZT-induced cardiomyopathy in rat. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 309-317
- 54 Maeda, H., Tatsuya, O. and Akaike, T. (1998) Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol. Chem.* **379**, 193-200
- 55 Ischiropoulos, H. (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 1-11
- 56 Heales, S. J. R., Bolanos, J. P., Stewart, V. C., Brookes, P. S., Land, J. M. and Clark, J. B. (1999) Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochem. Biophys. Acta* **1410**, 215-228
- 57 Browne, S. E., Ferrante, R. J. and Beal, M. F. (1999) Oxidative stress in huntington's disease. *Brain Pathol.* **9**, 147-163
- 58 Nava, E., Noll, G. and Luscher, T. F. (1995) Nitric oxide in cardiovascular diseases. *Ann. Med.* **27**, 343-351
- 59 Olezak, E. I., Zaczynska, E., Bhattacharjee, M., Butunoi, C., Legido, A. and Katsetos, C. D. (1998) Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine are found in monocytes/macrophages and/or astrocytes in acute, but not in chronic, multiple sclerosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **5**, 438-445
- 60 Bachmaier, K., Nikolaus, N., Pummerer, C., Duncan, G. S., Mak, T. W., Matsuyama, T. and Penninger, J. (1997) iNOS expression and nitrotyrosine formation in the myocardium in response to inflammation is controlled by the interferon regulatory transcription factor 1. *Circulation* **96**, 585-591

- 61 Moreno, J. J. and Pryor, W. A. (1992) Inactivation of α 1-proteinase inhibitor by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 425-431
- 62 Szabo, C. (1996) The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* **6**, 79-88
- 63 Ischiropoulos, H., Zhu, L. and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 446-451
- 64 Mulder, P., Korth, H.-G. and Ingold, K. U. (2005) Why quantum thermochemical calculations must be used with caution to indicate "a promising lead antioxidant". *Helv. Chim. Acta* **88**, 370-374
- 65 Kirsch, M. and de Groot, H. (2001) NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *FASEB J.* **15**, 1569-1574
- 66 Przybytkowski, E. and Averill-Bates, D. A. (1996) Correlation between glutathione and stimulation of the pentose phosphate cycle *in situ* in chinese hamster ovary cells exposed to hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **325**, 91-98
- 67 Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (1994) *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum, Heidelberg, Berlin, Oxford
- 68 Michaelis, L. (1939) Free radicals as intermediate steps of oxidation-reduction. In *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, pp. 33-46
- 69 Land, E. J. and Swallow, A. J. (1971) One-electron reactions in biochemical systems as studied by pulse radiolysis. IV. Oxidation of dihydronicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochim. Biophys. Acta* **234**, 34-42
- 70 Forni, L. G. and Willson, R. L. (1986) Thiyl and phenoxyl free radicals and NADH. *Biochem. J.* **240**, 897-903
- 71 Forsmark-André, P., Persson, B., Radi, R., Dallner, G. and Ernster, L. (1996) Oxidative modification of nicotinamide nucleotide transhydrogenase in submitochondrial particles: effect of endogenous ubiquinol. *Arch. Biochem. Biophys.* **336**, 113-120
- 72 Roy, P., Roy, S. K., Mitra, A. and Kulkarni, A. P. (1994) Superoxide generation by lipoxygenase in the presence of NADH and NADPH. *Biochim. Biophys. Acta* **1214**, 171-179
- 73 Quastel, J. H. and Wheatley, A. H. M. (1938) Anaerobic oxidations of ferricyanide as a reagent for the manometric investigation of dehydrogenase systems. *Biochem. J.* **32**, 936-943

- 74 Dolin, M. I. (1955) The DPNH-oxidizing enzymes of *Streptococcus faecalis*. II. The enzymes utilizing oxygen, cytochrome c, peroxide and 2,6-dichlorophenol-indophenol or ferricyanide as oxidants. Arch. Biochem. Biophys. **55**, 415-435
- 75 Singer, T. P. and Kearney, E. B. (1950) The non-enzymatic reduction of cytochrome c by pyridine nucleotides and its catalysis by various flavins. J. Biol. Chem. **183**, 409-429
- 76 Dixon, M. and Zerfas, L. G. (1940) The role of coenzymes in dehydrogenase systems. Biochem. J. **34**, 371-391
- 77 Dickens, F. and McIlwain, H. (1938) Phenazine compounds as carriers in the hexosemonophosphate system. Biochem. J. **32**, 1615-1625
- 78 Oikawa, S. and Kawanashi, S. (1996) Site-specific DNA damage induced by NADH in the presence of copper(II): role of active oxygen species. Biochemistry **35**, 4584-4590
- 79 Leopold, J. A., Zhang, Y.-Y., Scribner, A. W., Stanton, R. C. and Loscalzo, J. (2003) Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **23**, 411-417
- 80 Wakita, M., Nishimura, G. and Tamura, M. (1995) Some characteristics of the fluorescence lifetime of reduced pyridine nucleotides in isolated mitochondria, isolated hepatocytes, and perfused rat liver *in situ*. J. Biochem. **118**, 1151-1160
- 81 Wu, Y.-D. and Houk, K. N. (1991) Theoretical evaluation of conformational preferences of NAD⁺ and NADH: an approach to understanding the stereospecificity of NAD⁺/NADH-dependent dehydrogenases. J. Am. Chem. Soc. **113**, 2353-2358
- 82 Bodaness, R. S. (1982) The potential role of NADPH and cytoplasmic NADP-linked dehydrogenases in protection against singlet oxygen mediated cellular toxicity. Biochem. Biophys. Res. Commun. **108**, 1709-1715
- 83 Kuhn, D. M. and Geddes, T. J. (2002) Reduced nicotinamide nucleotides prevent nitration of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite. Brain. Res. **933**, 85-89
- 84 Stoppani, A. O. M. and Milstein, C. (1957) Essential role of thiol groups in aldehyde dehydrogenase. Biochem. J. **67**, 406-416
- 85 Hall, N. and Tomsett, A. B. (2000) Structure-function analysis of NADPH: nitrate reductase from *Aspergillus nidulans*: analysis of altered pyridine nucleotide specificity *in vivo*. Microbiol. **146**, 1399-1406

- 86 Bielski, B. H. J. and Chan, P. C. (1973) Enzyme-catalyzed free radical reactions with nicotinamide-adenine nucleotides. I. Lactate dehydrogenase-catalyzed chain oxidation of bound NADH by superoxide radicals. Arch. Biochem. Biophys. **159**, 873-879
- 87 Bielski, B. H. J. and Chan, P. C. (1974) Kinetic study by pulse radiolysis of the lactate dehydrogenase-catalyzed chain oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide by HO₂ and O₂^{•-}. J. Biol. Chem. **250**, 318-321
- 88 Bielski, B. H. J. and Chan, P. C. (1976) Re-evaluation of the kinetics of lactate dehydrogenase-catalyzed chain oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide by superoxide radicals in the presence of ethylenediaminetetraacetate. J. Biol. Chem. **251**, 3841-3844
- 89 Chan, P. C. and Bielski, B. H. J. (1974) Enzyme-catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotides. II. Lactate dehydrogenase-catalyzed oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by superoxide radicals generated by xanthine oxidase. J. Biol. Chem. **249**, 1317-1319
- 90 Chan, P. C. and Bielski, B. H. J. (1975) Lactate dehydrogenase-catalyzed stereospecific hydrogen atom transfer from reduced nicotinamide adenine dinucleotide to dicarboxylate radicals. J. Biol. Chem. **250**, 7266-7271
- 91 Chan, P. C. and Bielski, B. H. J. (1980) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-catalyzed chain oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by perhydroxyl radicals. J. Biol. Chem. **255**, 874-876
- 92 Gutierrez-Correa, J., Krauth-Siegel, R. L. and Stoppani, A. O. M. (2003) Phenothiazine radicals inactivate *Trypanosoma cruzi* dihydrolipoamide dehydrogenase: enzyme protection by radical scavengers. Free. Radic. Res. **37**, 281-291
- 93 Young, L. and Post, C. B. (1996) Catalysis by entropic guidance from enzymes. Biochemistry **35**, 15129-15133
- 94 Branden, C. I. and Eklund, H. (1980) Structure and mechanism of liver alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In Experientia-supplementum (Jeffery, J., ed.), pp. 40-84, Birkhäuser, Basel
- 95 Buehner, M. (1974) The architecture of the coenzyme binding domain in dehydrogenases as revealed by X-ray structure analysis. In Dehydrogenase Symposium, pp. 78-96, Konstanz, Germany

- 96 Rossmann, M. J., Liljas, A., Bränden, C.-J. and Banaszak, L. J. (1975) Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. Academic Press, New York
- 97 Hewitt, C. O., Eszes, C. M., Sessions, R. B., Moreton, K. M., Dafforn, T. R., Takei, J., Dempsey, C. E., Clarke, A. R. and Holbrook, J. J. (1999) A general method for relieving substrate inhibition in lactate dehydrogenases. *Protein. Eng.* **12**, 491-496
- 98 Zewe, V. and Fromm, H. J. (1962) Kinetic studies of rabbit muscle lactate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **237**, 1668-1675
- 99 Hakala, M. T., Glaid, A. J. and Schwert, G. W. (1956) Lactic Dehydrogenase II. Variation of kinetic and equilibrium constants with temperature. *J. Biol. Chem.* **221**, 191-209
- 100 Cahn, R. D., Kaplan, N. O., Levine, L. and Zwillig, E. (1962) Nature and development of lactic dehydrogenase. *Science* **136**, 962-969
- 101 Winer, A. D. and Schwert, G. W. (1959) Lactic dehydrogenase: fluorescence spectra of ternary complexes of lactic dehydrogenase, reduced diphosphopyridine nucleotide, and carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* **234**, 1155-1161
- 102 Moore, J. W. and Pearson, R. G. (1981) Kinetics and mechanism. Wiley-Interscience
- 103 Bergmeyer, H. U. (1974) Methoden der Enzymatischen Analyse. Band II. Verlag Chemie, Weinheim
- 104 Bergmeyer, H. U. (1983) Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weinheim
- 105 Holmberg, N., Ryde, U. and Bülow, L. (1999) Redesign of the coenzyme specificity in L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* using site-directed mutagenesis and media engineering. *Protein Engineering* **12**, 851-856
- 106 Guillot, B., Muzet, N., Artacho, E., Lecomte, C. and Jelsch, C. (2003) Experimental and theoretical electron density studies in large molecules: NAD⁺, β -nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Phys. Chem. B* **107**, 9109-9121
- 107 Velick, S. F., Hayes, J. E. and Harting, J. (1953) The binding of diphosphopyridine nucleotide by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **203**, 527-544
- 108 Rafter, G. W., Chaykin, S. and Krebs, E. G. (1954) The action of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on reduced diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* **208**, 799-812
- 109 Bernofsky, C. and Wanda, S.-Y. C. (1982) Formation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide peroxide. *J. Biol. Chem.* **257**, 6809-6817

- 110 Petrat, F., Paluch, S., Dogruöz, E., Dörfler, P., Kirsch, M., Korth, H.-G., Sustmann, R. and de Groot, H. (2003) Reduction of iron(III) ions complexed to physiological ligands by lipoyl dehydrogenase and other flavoenzymes *in vitro*. Implications for an enzymatic reduction of Fe(III) ions of the labile iron pool. *J. Biol. Chem.* **278**, 46403-46413
- 111 Scheeline, A., Olson, D. L., Williksen, E. P. and Horras, G. A. (1997) The peroxidase-oxidase oscillator and its constituent chemistries. *Chem. Rev.* **97**, 739-756
- 112 Evans, P. J. and Halliwell, B. (1994) Measurement of iron and copper in biological systems: bleomycin and copper-phenanthroline assays. *Methods Enzymol.* **233**, 82-92
- 113 Kirsch, M. and de Groot, H. (1999) Reaction of peroxynitrite with reduced nicotinamide nucleotides, formation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **274**, 24664-24670
- 114 Goldstein, S. and Czapski, G. (1997) Reactivity of peroxynitric acid (O_2NOOH): a pulse radiolysis study. *Inorg. Chem.* **36**, 4156-4162
- 115 Fabbri, E., Barbin, L., Capuzzo, A. and Biondi, C. (1998) Adenylyl cyclase activity and glucose release from the liver of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Am. J. Physiol.* **275**, R1563-R1570
- 116 Petrat, F., Bramey, T., Kirsch, M. and de Groot, H. (2005) Initiation of a superoxide-dependent chain oxidation of lactate dehydrogenase-bound NADH by oxidants of low and high reactivity. *Free Radic. Res.* **39**, 1043-1057
- 117 Ianni, J. C. (2005) <http://www.kineticus.com>.
- 118 Yokota, K. and Yamazaki, I. (1977) Analysis and computer simulation of aerobic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide catalyzed by horseradish peroxidase. *Biochemistry* **16**, 1913-1920
- 119 Garcia-Nogales, P., Almeida, A. and Bolaños, J. P. (2003) Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection. *J. Biol. Chem.* **278**, 864-874
- 120 Swintek, A. U., Christoph, S., Petrat, F., de Groot, H. and Kirsch, M. (2004) Cell type-dependent release of nitric oxide and/or reactive nitrogenoxide species from intracellular SIN-1: effects on cellular NAD(P)H. *Biol. Chem.* **385**, 639-648
- 121 Lomonosova, E., Kirsch, M., Rauen, U. and de Groot, H. (1998) The critical role of Hepes in SIN-1 cytotoxicity, peroxynitrite versus hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 522-552

- 122 Schönafinger, K. (1999) Heterocyclic NO prodrugs. *Il Farmaco* **54**, 316-320
- 123 Goldstein, S. and Czapski, G. (2000) Reactivity of peroxynitrite versus simultaneous generation of NO[•] and O₂^{•-} toward NADH. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 736-741
- 124 Kirsch, M. and de Groot, H. (2000) Ascorbate is a potent antioxidant against peroxynitrite-induced oxidation reactions. *J. Biol. Chem.* **275**, 16702-16708
- 125 Winer, A. D., Schwert, G. W. and Millar, D. B. S. (1959) Lactic dehydrogenase: fluorimetric measurements of the complex of enzyme and reduced diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* **234**, 1149-1154
- 126 Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. and Bourne, P. E. (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235-242
- 127 Prütz, W. A., Mönig, H., Butler, J. and Land, E. J. (1985) Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 125-134
- 128 Behar, D., Czapski, G., Rabani, J., Dorfman, L. M. and Schwarz, H. A. (1970) The acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl radical. *J. Phys. Chem.* **74**, 3209-3213
- 129 Salmon, J.-M., Kohen, E., Viallet, P., Hirschberg, J. G., Wouters, A. W., Kohen, C. and Thorell, B. (1982) Microspectrofluorometric approach to the study of free/bound NAD(P)H ratio as metabolic indicator in various cell types. *Photochem. Photobiol.* **36**, 585-593
- 130 Jain, M., Brenner, D. A., Cui, L., Lim, C. C., Wang, B., Pimentel, D. R., Koh, S., Sawyer, D. B., Leopold, J. A., Handy, D. E., Loscalzo, J., Apstein, C. S. and Liao, R. (2003) Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates cytosolic redox status and contractile phenotype in adult cardiomyocytes. *Circ. Res.* **93**, e9-e16
- 131 Minard, K. I. and McAlister-Henn, L. (2001) Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 832-843
- 132 Yang, J.-H. and Park, J.-W. (2003) Oxalomalate, a competitive inhibitor of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase, enhances lipid peroxidation-mediated oxidative damage in U937 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **416**, 31-37
- 133 Wang, P. and Zweier, J. L. (1996) Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. *J. Biol. Chem.* **271**, 29223-29230

- 134 Radák, Z., Nakamura, A., Nakamoto, H., Asano, K., Ohno, H. and Goto, S. (1998) A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lung of rats. *Eur. J. Physiol.* **435**, 439-441
- 135 Ido, Y., Chang, K., Woolsey, T. A. and Williamson, J. R. (2001) NADH: sensor of blood flow need in brain, muscle, and other tissues. *FASEB J.* **15**, 1419-1421
- 136 Radák, Z., Asano, K., Inoue, M., Kizaki, T., Oh-ishi, S., Suzuki, K., Taniguchi, N. and Ohno, H. (1995) Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol.* **79**, 129-135
- 137 Albe, K. R., Butler, M. H. and Wright, B. E. (1990) Cellular concentrations of enzymes and their substrates. *J. Theor. Biol.* **143**, 163-195
- 138 Aragón, J. J. and Sols, A. (1991) Regulation of enzyme activity in the cell: effect of enzyme concentration. *FASEB J.* **5**, 2945-2950
- 139 Srere, P. A. (1967) Enzyme concentrations in tissues. *Science* **158**, 936-937
- 140 Saltelli, A., Ratto, M., Tarantola, S. and Campolongo, F. (2005) Sensitivity analysis for chemical models. *Chem. Rev.* **105**, 2811-2828
- 141 Rivera-Nieves, J., Thompson, W. C., Levine, R. L. and Moss, J. (1999) Thiols mediate superoxide-dependent NADH modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **274**, 19525-19531
- 142 Chandra, A., Sristava, S., Petrash, J. M., Bhatnagar, A. and Sristava, S. K. (1997) Active site modification of aldose reductase by nitric oxide donors. *Biochim. Biophys. Acta* **1341**, 217-222
- 143 Schreiner, E. and Freundt, K. J. (1987) Stability of isolated hepatic aldehyde dehydrogenases from rats *in vitro*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **37**, 181-183
- 144 Hühmer, A. F. R., Counts Gerber, N., Ortiz de Montellano, P. R. and Schöneich, C. (1996) Peroxynitrite reduction of calmodulin stimulation of neuronal nitric oxide synthase. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 484-491
- 145 Uppu, R. M. and Pryor, W. A. (1996) Synthesis of peroxynitrite in a two-phase system using isoamyl nitrite and hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* **236**, 242-249
- 146 Bergmeyer, H. U. (1986) *Methods of Enzymatic Analysis. Samples, Reagents, Assessment of Results.* (Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Graßl, M., eds.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

- 147 Dickinson, F. M. (1970) The binding of dihydronicotinamide-adenine dinucleotide and pyridine-3-aldehyde-adenine dinucleotide by yeast alcohol dehydrogenase. *Biochem. J.* **120**, 821-830
- 148 Karlović, D., Amiguet, P., Bonner, F. J. and Luisi, P. L. (1976) Spectroscopic investigation of binary and ternary coenzyme complexes of yeast alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **66**, 277-284
- 149 DeMaster, E. G., Redfern, B., Quast, B. J., Dahlseid, T. and Nagasawa, H. T. (1997) Mechanism for the inhibition of aldehyde dehydrogenase by nitric oxide. *Alcohol* **14**, 181-189
- 150 Smith, D. J., Maggio, E. T. and Kenyon, G. L. (1975) Simple alkanethiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes. *Biochemistry* **14**, 766-771
- 151 Au, S. W., Gover, S., Lam, V. M. and Adams, M. J. (2000) Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure* **8**, 293-303
- 152 Reynolds, C. H., Kuchel, P. W. and Dalziel, K. (1978) Equilibrium binding of coenzymes and substrates to nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-linked isocitrate dehydrogenase from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **171**, 733-742
- 153 Krause, J., Bühner, M. and Sund, H. (1974) Studies of glutamate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **41**, 593-602
- 154 Wolfe, S. K. and Swinehart, H. J. (1975) Photochemistry of pentacyanonitrosylferrate(2-), Nitroprusside. *Inorg. Chem.* **14**, 1049-1053
- 155 Kirsch, M., Lomonosova, E. E., Korth, H. G., Sustmann, R. and de Groot, H. (1998) Hydrogen peroxide formation by reaction of peroxynitrite with HEPES and related tertiary amines. Implications for a general mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**, 12716-12724
- 156 Novoa, W. B., Winer, A. D., Glaid, A. J. and Schwert, G. W. (1959) Lactic dehydrogenase: inhibition by oxamate and by oxalate. *J. Biol. Chem.* **234**, 1143-1148
- 157 Vajda, S., Valko, P. and Turanyi, T. (1985) Principal component analysis of kinetic models. *Int. J. Chem. Kinet.* **17**, 55-81

7. ANHANG

7.1. ABKÜRZUNGEN

| | |
|-------------------------|--|
| A [•] | radikalisches Antioxidans |
| ADH | Alkohol-Dehydrogenase |
| AH | Antioxidans |
| ALDH | Aldehyd-Dehydrogenase |
| B _r | Overall Sensitivity Coefficient |
| DTPA | Diethylenetriaminpentaessigsäure |
| G6-PDH | Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| H4Bip | Tetrahydrobiopterin |
| hPa | Hektopascal |
| ICDH | Isocitrat-Dehydrogenase |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| MDH | Malat-Dehydrogenase |
| min | Minute |
| NADH/NAD ⁺ | reduziertes/oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid |
| NADPH/NADP ⁺ | reduziertes/oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat |
| NSC | Normalized Sensitivity Constant |
| p | Partialdruck |
| PCA | Principal Component Analysis |
| R | Rest |
| R [•] | Lipidradikal |
| RH | Lipid |
| ROO [•] | aus dem Lipid entstandenes Perhydroxylradikal |
| RNOS | Reaktive Stickstoff-Sauerstoffspezies (reactive nitrogen oxygen species) |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species) |
| s | Sekunde |
| SIN-1 | 3-Morpholinosydnominin |
| SOD | Superoxid-Dismutase |
| t _{1/2} | Halbwertszeit |

7. Anhang

7.2. TABELLEN

Tabelle IS. An der Autoxidation von NADH in Anwesenheit von LDH beteiligte Reaktionen der Priorität nach angeordnet

| Nummer | Eintrag in Tabelle 1 | Reaktion | Geschwindigkeitskonstante ^a [M ⁻¹ s ⁻¹] | B _r ^b |
|--------|----------------------|--|---|-----------------------------|
| 1 | 3 | LDH-NADH + O ₂ → LDH-NAD [•] + HOO [•] | 1,6 × 10 ⁻⁴ | 349,6 |
| 2 | 9 | LDH-NADH + H ₂ O ₂ → LDH-NAD [•] + H ₂ O + HO [•] | 2,0 × 10 ⁻⁴ | 276,1 |
| 3 | 6 | LDH-NADH + O ₂ ^{•-} → LDH-NAD [•] + HOO ⁻ | 3,6 × 10 ⁴ | 264,4 |
| 4 | 33 | LDH-NAD [•] + O ₂ → LDH-NAD ⁺ + O ₂ ^{•-} | 3,2 × 10 ⁹ | 250,3 |
| 5 | | H ₂ O ₂ + HO [•] → HOO [•] + H ₂ O | 2,7 × 10 ⁷ | 245,1 |
| 6 | | O ₂ ^{•-} + H ₃ O ⁺ → HOO [•] + H ₂ O | 5,0 × 10 ¹⁰ | 150,1 |
| 7 | | HOO [•] + H ₂ O → O ₂ ^{•-} + H ₃ O ⁺ | 1,4 × 10 ⁴ | 129,9 |
| 8 | | O ₂ ^{•-} + HOO [•] → HOO ⁻ + O ₂ | 9,7 × 10 ⁷ | 98,8 |
| 9 | 16 | LDH + NADH → LDH-NADH | 1,0 × 10 ⁶ | 76,9 |
| 10 | 18 | LDH-NADH → LDH + NADH | 1,0 × 10 ¹ | 66,9 |
| 11 | | HOO ⁻ + H ₃ O ⁺ → H ₂ O ₂ + H ₂ O | 5,0 × 10 ¹⁰ | 50,3 |
| 12 | 34 | 2 NAD [•] → (NAD) ₂ | 5,6 × 10 ⁷ | 50,0 |
| 13 | 2 | NADH + H ₃ O ⁺ → HNADH ⁺ + H ₂ O | 7,0 | 49,9 |
| 14 | 10 | NADH + HOO [•] → NAD [•] + H ₂ O ₂ | 1,8 × 10 ⁵ | 49,3 |
| 15 | | H ₂ O ₂ + H ₂ O → HOO ⁻ + H ₃ O ⁺ | 3,2 × 10 ⁻³ | 48,7 |
| 16 | 32 | NAD [•] + O ₂ → NAD ⁺ + O ₂ ^{•-} | 2,0 × 10 ⁹ | 45,2 |
| 17 | 23 | LDH-NAD ⁺ → LDH + NAD ⁺ | 2,5 × 10 ² | 44,6 |
| 18 | 21 | LDH + NAD ⁺ → LDH-NAD ⁺ | 1,0 × 10 ⁶ | 44,4 |
| 19 | 1 | NADH + O ₂ → NAD ⁺ + HOO ⁻ | 6,8 × 10 ⁻¹⁰ | 17,1 |
| 20 | | HO [•] + O ₂ ^{•-} → O ₂ + HO ⁻ | 1,1 × 10 ¹⁰ | 15,3 |
| 21 | 11 | LDH-NADH + HOO [•] → LDH-NAD [•] + H ₂ O ₂ | 2,0 × 10 ⁶ | 8,8 |
| 22 | | HOO ⁻ + HO [•] → HOO [•] + HO ⁻ | 7,5 × 10 ⁹ | 7,0 |
| 23 | | 2 HO [•] → H ₂ O ₂ | 5,5 × 10 ⁹ | 6,6 |

^a Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen, an denen Wasser beteiligt ist, wurden durch [H₂O]₀ = 55,56 M geteilt.

^b B_r = Overall Sensitivity Coefficient

NADH (150 μM) wurde in Anwesenheit von LDH (10 μM) unter normoxischen Bedingungen ([O₂] = 225 μM) in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0, 25°C) inkubiert. Die Prioritäten der beteiligten Reaktionen wurden durch Anwendung einer PCA auf die von der Kintecus- und der Atropos-Software ermittelten NSCs kalkuliert.

7. Anhang

Tabelle IIS. An der Oxidation von NADH in Anwesenheit von LDH, H₂O₂ und O₂ beteiligte Reaktionen der Priorität nach angeordnet

| Nummer | Eintrag in Tabelle 1 | Reaktion | Geschwindigkeitskonstante ^a [M ⁻¹ s ⁻¹] | B _r ^b |
|--------|----------------------|--|---|-----------------------------|
| 1 | 9 | LDH-NADH + H ₂ O ₂ → LDH-NAD [•] + H ₂ O + HO [•] | 2,0 × 10 ⁻⁴ | 420,9 |
| 2 | | H ₂ O ₂ + HO [•] → HOO [•] + H ₂ O | 2,7 × 10 ⁷ | 344,6 |
| 3 | 33 | LDH-NAD [•] + O ₂ → LDH-NAD ⁺ + O ₂ ^{•-} | 3,2 × 10 ⁹ | 252,3 |
| 4 | 6 | LDH-NADH + O ₂ ^{•-} → LDH-NAD [•] + HOO ⁻ | 3,6 × 10 ⁴ | 246,9 |
| 5 | | HOO [•] + H ₂ O → O ₂ ^{•-} + H ₃ O ⁺ | 1,4 × 10 ⁴ | 117,2 |
| 6 | | O ₂ ^{•-} + H ₃ O ⁺ → HOO [•] + H ₂ O | 5,0 × 10 ¹⁰ | 116,8 |
| 7 | | O ₂ ^{•-} + HOO [•] → HOO ⁻ + O ₂ | 9,7 × 10 ⁷ | 98,4 |
| 8 | 10 | NADH + HOO [•] → NAD [•] + H ₂ O ₂ | 1,8 × 10 ⁵ | 86,4 |
| 9 | 16 | LDH + NADH → LDH-NADH | 1,0 × 10 ⁶ | 61,1 |
| 10 | 18 | LDH-NADH → LDH + NADH | 1,0 × 10 ¹ | 61,0 |
| 11 | 32 | NAD [•] + O ₂ → NAD ⁺ + O ₂ ^{•-} | 2,0 × 10 ⁹ | 52,3 |
| 12 | | HOO ⁻ + H ₃ O ⁺ → H ₂ O ₂ + H ₂ O | 5,0 × 10 ¹⁰ | 50,3 |
| 13 | | H ₂ O ₂ + H ₂ O → HOO ⁻ + H ₃ O ⁺ | 3,2 × 10 ⁻³ | 50,0 |
| 14 | 2 | NADH + H ₃ O ⁺ → HNADH ⁺ + H ₂ O | 7,0 | 49,9 |
| 15 | 23 | LDH-NAD ⁺ → LDH + NAD ⁺ | 2,5 × 10 ² | 42,6 |
| 16 | 11 | LDH-NADH + HOO [•] → LDH-NAD + H ₂ O ₂ | 2,0 × 10 ⁶ | 7,1 |
| 17 | 3 | LDH-NADH + O ₂ → LDH-NAD [•] + HOO [•] | 1,6 × 10 ⁻⁴ | 7,0 |
| 18 | 1 | NADH + O ₂ → NAD ⁺ + HOO ⁻ | 6,8 × 10 ⁻¹⁰ | 2,2 |

^a Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen, an denen Wasser beteiligt ist, wurden durch [H₂O]₀ = 55,56 M geteilt.

^b B_r = Overall Sensitivity Coefficient

NADH (150 μM) wurde in Anwesenheit von LDH (10 μM) unter normoxischen Bedingungen ([O₂] = 225 μM) mit H₂O₂ (600 μM) in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0, 25°C) inkubiert. Die Prioritäten der beteiligten Reaktionen wurden durch Anwendung einer PCA auf die von der Kintecus- und der Atropos-Software ermittelten NSCs kalkuliert.

7. Anhang

Table IIIS. An der Oxidation von NADH (150 μM) in Anwesenheit von Peroxynitrit beteiligte Reaktionen der Priorität nach angeordnet

| Nummer | Eintrag in Tabelle 1 | Reaktion | Geschwindigkeitskonstante ^a [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$] | B_r ^b |
|--------|----------------------|--|--|--------------------|
| 1 | | $\text{ONOO}^- + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{ONOOH} + \text{H}_2\text{O}$ | $5,0 \times 10^{10}$ | 49488,3 |
| 2 | | $\text{ONOOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ONOO}^- + \text{H}_3\text{O}^+$ | 143 | 46205,6 |
| 3 | | $\text{ONOOH} \rightarrow \text{HNO}_3$ | 0,94 | 17982,8 |
| 4 | 12 | $\text{NADH} + \text{ONOOH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^* + \text{}^*\text{NO}_2$ | $7,4 \times 10^3$ | 6514,3 |
| 5 | | $\text{HNO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{NO}_2^-$ | $7,2 \times 10^5$ | 2745,4 |
| 6 | | $\text{H}_3\text{O}^+ + \text{}^*\text{NO}_2 \rightarrow \text{HNO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ | $5,0 \times 10^{10}$ | 2713,2 |
| 7 | | $\text{ONOOH} \rightarrow \text{HO}^* + \text{}^*\text{NO}_2$ | 0,36 | 2274,7 |
| 8 | 15 | $\text{NADH} + \text{}^*\text{NO}_2 \rightarrow \text{NAD}^* + \text{HNO}_2$ | $4,0 \times 10^3$ | 894,7 |
| 9 | | $2 \text{HNO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}$ | 13,4 | 632,4 |
| 10 | | $\text{O}_2\text{NOO}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{O}_2$ | 1,4 | 487,6 |
| 11 | 32 | $\text{NAD}^* + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{O}_2^{\bullet-}$ | $2,0 \times 10^9$ | 403,6 |
| 12 | | $\text{HO}^* + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{HO}^- + \text{}^*\text{NO}_2$ | $5,3 \times 10^9$ | 352,8 |
| 13 | | $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{}^*\text{NO}_2 \rightarrow \text{O}_2\text{NOO}^-$ | $4,5 \times 10^9$ | 322,3 |
| 14 | | $\text{O}^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HO}^* + \text{HO}^-$ | $1,7 \times 10^6$ | 321,1 |
| 15 | | $\text{HO}^* + \text{HO}^- \rightarrow \text{O}^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}$ | $1,3 \times 10^{10}$ | 318,4 |
| 16 | | $\text{O}_2\text{NOOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2\text{NOO}^- + \text{H}_3\text{O}^+$ | $1,4 \times 10^3$ | 220,2 |
| 17 | | $\text{H}_3\text{O}^+ + \text{O}_2\text{NOO}^- \rightarrow \text{O}_2\text{NOOH} + \text{H}_2\text{O}$ | $5,0 \times 10^{10}$ | 215,3 |
| 18 | | $\text{O}^{\bullet-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_3^{\bullet-}$ | $3,8 \times 10^9$ | 159,8 |
| 19 | 13 | $\text{NADH} + \text{O}_2\text{NOOH} \rightarrow \text{}^*\text{NO}_2 + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$ | $1,0 \times 10^4$ | 140,9 |
| 20 | | $\text{O}_3^{\bullet-} \rightarrow \text{O}^{\bullet-} + \text{O}_2$ | $4,0 \times 10^3$ | 136,3 |
| 21 | | $\text{N}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{}^*\text{NO} + \text{}^*\text{NO}_2$ | $8,0 \times 10^4$ | 131,0 |
| 22 | | $\text{HOO}^* + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_3\text{O}^+$ | $1,4 \times 10^4$ | 129,9 |
| 23 | | $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{HOO}^* + \text{H}_2\text{O}$ | $5,0 \times 10^{10}$ | 129,2 |
| 24 | | $\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} (+ \text{HPO}_4^{2-}) \rightarrow 2 \text{HNO}_2$ | $2,0 \times 10^3 +$ $8,0 \times 10^5 \times [\text{HPO}_4^{2-}]$ | 120,7 |
| 25 | | $\text{ONOO}^- + \text{HO}^* \rightarrow \text{HO}^- + \text{}^*\text{NO} + \text{O}_2$ | $4,8 \times 10^9$ | 117,9 |
| 26 | | $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{}^*\text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$ | $6,7 \times 10^9$ | 95,6 |
| 27 | | $\text{NO}_2^+ + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_3 + \text{H}_3\text{O}^+$ | $9,0 \times 10^6$ | 86,7 |
| 28 | | $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}_3\text{O}^+$ | $2,0 \times 10^{10}$ | 80,4 |

7. Anhang

| | | | | |
|----|----|---|----------------------|------|
| 29 | | $\text{HOO}^- + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ | $5,0 \times 10^{10}$ | 80,4 |
| 30 | | $\text{}^*\text{NO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{}^*\text{NO}_2 + 2 \text{HO}^-$ | $1,0 \times 10^3$ | 80,2 |
| 31 | | $\text{ONOOH} + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{NO}_2^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$ | 6,22 | 80,0 |
| 32 | 34 | $2 \text{NAD}^{\bullet} \rightarrow (\text{NAD})_2$ | $5,6 \times 10^7$ | 80,0 |
| 33 | | $\text{HO}^{\bullet} + \text{O}_3^{\bullet-} \rightarrow \text{HO}^- + \text{O}_3$ | $8,5 \times 10^9$ | 80,0 |
| 34 | 2 | $\text{NADH} + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{HNADH}^+ + \text{H}_2\text{O}$ | 7,0 | 80,0 |
| 35 | | $\text{NO}_3^- + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ | $5,0 \times 10^{10}$ | 80,0 |
| 36 | | $\text{O}^{\bullet-} + \text{}^*\text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$ | $1,8 \times 10^7$ | 79,8 |
| 37 | | $\text{O}_2\text{NOO}^- \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-} + \text{}^*\text{NO}_2$ | 1,05 | 79,6 |
| 38 | | $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOO}^- + \text{H}_3\text{O}^+$ | $3,2 \times 10^{-3}$ | 79,4 |
| 39 | | $2 \text{}^*\text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_4$ | $4,5 \times 10^8$ | 69,0 |
| 40 | | $\text{N}_2\text{O}_4 \rightarrow 2 \text{}^*\text{NO}_2$ | $6,9 \times 10^3$ | 56,1 |
| 41 | 10 | $\text{NADH} + \text{HOO}^{\bullet} \rightarrow \text{NAD}^{\bullet} + \text{H}_2\text{O}_2$ | $1,8 \times 10^5$ | 51,5 |
| 42 | | $\text{ONOO}^- \rightarrow \text{O}^{\bullet-} + \text{}^*\text{NO}_2$ | $1,7 \times 10^{-6}$ | 40,1 |
| 43 | | $\text{N}_2\text{O}_4 (+ \text{H}_2\text{O}) \rightarrow \text{HNO}_2 + \text{HNO}_3$ | 18,0 | 35,9 |
| 44 | | $\text{}^*\text{NO} + \text{}^*\text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$ | $1,1 \times 10^9$ | 25,1 |

^a Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen, an denen Wasser beteiligt ist, wurden durch $[\text{H}_2\text{O}]_0 = 55,56 \text{ M}$ geteilt.

^b B_i = Overall Sensitivity Coefficient

NADH (150 μM) wurde in Anwesenheit von LDH (10 μM) unter normoxischen Bedingungen ($[\text{O}_2] = 225 \mu\text{M}$) Peroxynitrit (100 μM) in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 25 °C) inkubiert. Die Prioritäten der beteiligten Reaktionen wurden durch Anwendung einer PCA auf die von der Kintecus- und der Atropos Software ermittelten NSCs kalkuliert.

7.3. VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DIESER ARBEIT

Originalarbeiten

Frank Petrat, **Thorsten Bramey**, Michael Kirsch, & Herbert de Groot (2005) Initiation of a superoxide-dependent chain oxidation of lactate dehydrogenase-bound NADH by oxidants of low and high reactivity

Free Radic. Res. **39** (10), 1043-1057

Frank Petrat, **Thorsten Bramey**, Michael Kirsch, Uta Kerkweg, & Herbert de Groot (2006) Enhanced oxidation of NAD(P)H by oxidants in the presence of dehydrogenases but no evidence for a superoxide-propagated chain oxidation of the bound coenzymes

Free Radic. Res. **40** (8), 857-863

Tagungsbeiträge

Thorsten Bramey, Michael Kirsch, Herbert de Groot und Frank Petrat. Reaktion des binären Lactat-Dehydrogenase-NADH Komplexes mit Oxidantien unterschiedlicher Reaktivität

Vortrag, 2. Xantener Gespräch zur Medizinisch-Biologischen Chemie, 9.-11. Dezember 2004

7.4. WEITERE VERÖFFENTLICHUNGEN

Katja Pamp, **Thorsten Bramey**, Michael Kirsch, Herbert de Groot, & Frank Petrat (2005) NAD(H) Enhances the Cu(II)-mediated inactivation of lactate dehydrogenase by increasing the accessibility of sulfhydryl groups

Free Radic. Res. **39** (1), 31-40

Herbert de Groot, Oliver Auferkamp, **Thorsten Bramey**, Klaus de Groot, Michael Kirsch, Hans-Gerd Korth, Frank Petrat, & Reiner Sustmann (2006) Non-oxygen-forming pathways of hydrogen peroxide degradation by bovine liver catalase at low hydrogen peroxide fluxes

Free Radic. Res. **40** (1), 67-74

7.5. LEBENSLAUF

| | |
|----------------------------|-----------------|
| Name | Thorsten Bramey |
| geboren am | 11.03.1974 |
| Familienstand | ledig |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

Schulbildung

| | |
|--------------------|---------------------------------|
| 1980 – 1984 | Overberger Grundschule |
| 1984 – 1994 | Städtisches Gymnasium Bergkamen |

Hochschulausbildung

| | |
|--------------------|--|
| 1996 – 1998 | Grundstudium der Biologie an der Freien Universität Berlin |
| 1998 – 2002 | Hauptstudium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin; Abschluss: Diplom Biologe |

Promotion

| | |
|--------------------|---|
| 2003 – dato | Promotion am Institut für Physiologische Chemie (Prof. Dr. Dr. H. de Groot) des Universitätsklinikums Essen |
|--------------------|---|